



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 199 40 764.9

Anmeldetag: 27. August 1999

Anmelder/Inhaber: BASF Aktiengesellschaft, Ludwigshafen/DE

Bezeichnung: Corynebacterium Glutamicum-Gene, die Proteine codieren, die an der Membransynthese und am Membrantransport beteiligt sind.

IPC: C 07 K, C 12 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 19. Juli 2000
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT

BEST AVAILABLE COPY

Patentansprüche

1. Isoliertes Nukleinsäuremolekül aus *Corynebacterium glutamicum*, das ein MCT-Protein oder einen Abschnitt davon codiert.
5
2. Isoliertes Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 1, wobei das Nukleinsäuremolekül ein MCT-Protein codiert, welches an der Produktion einer Feinchemikalie beteiligt ist.
10
3. Isoliertes Nukleinsäuremolekül aus *Corynebacterium glutamicum*, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus den in Anhang A aufgeführten Sequenzen oder einem Abschnitt davon.
15
4. Isoliertes Nukleinsäuremolekül, das eine Polypeptidsequenz codiert, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus den in Anhang B angegebenen Sequenzen.
- 20 5. Isoliertes Nukleinsäuremolekül, das eine natürlich vorkommende allelische Variante eines Polypeptides codiert, ausgewählt aus der Gruppe von Aminosäuresequenzen, bestehend aus den in Anhang B aufgeführten Sequenzen.
- 25 6. Isoliertes Nukleinsäuremolekül, umfassend eine Nukleotidsequenz, die zu mindestens 50% zu einer Nukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus den in Anhang A angegebenen Sequenzen oder einem Abschnitt davon, homolog ist.
- 30 7. Isoliertes Nukleinsäuremolekül, umfassend ein Fragment mit mindestens 15 Nukleotiden einer Nukleinsäure mit einer Nukleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus den in Anhang A angegebenen Sequenzen.
- 35 8. Isoliertes Nukleinsäuremolekül, das unter stringenten Bedingungen an ein Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1-7 hybridisiert.
9. Isoliertes Nukleinsäuremolekül, umfassend das Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1-8 oder einen Abschnitt davon und eine Nukleotidsequenz, die ein heterologes Polypeptid codiert.
40

2

10. Vektor, umfassend das Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 1-9.
11. Vektor nach Anspruch 10, welcher ein Expressionsvektor ist.
- 5 12. Wirtszelle, die mit dem Expressionsvektor nach Anspruch 11 transfiziert ist.
- 10 13. Wirtszelle nach Anspruch 12, wobei die Zelle ein Mikroorganismus ist.
14. Wirtszelle nach Anspruch 13, wobei die Zelle zur Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* gehört.
- 15 15. Wirtszelle nach Anspruch 12, wobei die Expression des Nukleinsäuremoleküls eine Modulation der Produktion einer Feinchemikalie von der Zelle bewirkt.
- 20 16. Wirtszelle nach Anspruch 15, wobei die Feinchemikalie ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus organischen Säuren, proteinogenen und nichtproteinogenen Aminosäuren, Purin- und Pyrimidinbasen, Nukleosiden, Nukleotiden, Lipiden, gesättigten und ungesättigten Fettsäuren, Diolen, Kohlehydraten, aromatischen Verbindungen, Vitaminen, Cofaktoren und Enzymen.
- 25 17. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptides, umfassend das Züchten der Wirtszelle nach Anspruch 12 in einem geeigneten Kulturmedium, um so das Polypeptid zu produzieren.
- 30 18. Isoliertes MCT-Polypeptid aus *Corynebacterium glutamicum* oder ein Abschnitt davon.
19. Polypeptid nach Anspruch 18, wobei das Polypeptid an der Produktion einer Feinchemikalie beteiligt ist.
- 35 20. Isoliertes Polypeptid, umfassend eine Aminosäuresequenz, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus den in Anhang B angegebenen Sequenzen.
- 40 21. Isoliertes Polypeptid, umfassend eine natürlich vorkommende allelische Variante eines Polypeptides, umfassend eine Aminosäuresequenz, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus den in Anhang B angegebenen Sequenzen, oder einen Abschnitt davon.
- 45 22. Isoliertes Polypeptid nach einem der Ansprüche 18-21, das zudem heterologe Aminosäuresequenzen umfaßt.

3

23. Isoliertes Polypeptid, das von einem Nukleinsäuremolekül codiert wird, umfassend eine Nukleotidsequenz, die mindestens zu 50% homolog zu einer Nukleinsäure ist, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus den in Anhang A angegebenen Sequenzen.
- 5
24. Isoliertes Polypeptid, umfassend eine Aminosäuresequenz, die mindestens zu 50% homolog zu einer Aminosäuresequenz ist, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus den in Anhang B angegebenen Sequenzen.
- 10
25. Verfahren zur Herstellung einer Feinchemikalie, umfassend das Züchten einer Zelle, die einen Vektor nach Anspruch 12 enthält, so daß die Feinchemikalie produziert wird.
- 15
26. Verfahren nach Anspruch 25, wobei das Verfahren zudem den Schritt Gewinnen der Feinchemikalie aus der Kultur umfaßt.
27. Verfahren nach Anspruch 25, wobei das Verfahren zudem den Schritt Transfizieren der Zelle mit dem Vektor nach Anspruch 11 umfaßt, so daß eine Zelle erhalten wird, die den Vektor enthält.
- 20
28. Verfahren nach Anspruch 25, wobei die Zelle zur Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* gehört.
- 25
29. Verfahren nach Anspruch 25, wobei die Zelle ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium herculis*, *Corynebacterium lilium*, *Corynebacterium acetoacidophilum*, *Corynebacterium acetoglutamicum*, *Corynebacterium acetophilum*, *Corynebacterium ammoniagenes*, *Corynebacterium fujiokense*, *Corynebacterium nitrilophilus*, *Brevibacterium ammoniagenes*, *Brevibacterium butanicum*, *Brevibacterium divaricatum*, *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium healii*, *Brevibacterium ketoglutamicum*, *Brevibacterium ketosoreductum*, *Brevibacterium lactofermentum*, *Brevibacterium linens*, *Brevibacterium paraffinolyticum* und den in Tabelle 3 angegebenen Stämmen.
- 30
30. Verfahren nach Anspruch 25, wobei die Expression des Nukleinsäuremoleküls aus dem Vektor die Modulation der Produktion der Feinchemikalie bewirkt.
- 40
31. Verfahren nach Anspruch 25, wobei die Feinchemikalie ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus organischen Säuren, proteinogenen und nichtproteinogenen Aminosäuren, Purin- und Pyrimidinbasen, Nukleosiden, Nukleotiden, Lipiden, gesättig-
- 45

4

ten und ungesättigten Fettsäuren, Diolen, Kohlehydraten, aromatischen Verbindungen, Vitaminen, Cofaktoren und Enzymen.

32. Verfahren nach Anspruch 25, wobei die Feinchemikalie eine
5 Aminosäure ist.
33. Verfahren nach Anspruch 32, wobei die Aminosäure aus der
Gruppe stammt, bestehend aus Lysin, Glutamat, Glutamin,
Alanin, Aspartat, Glycin, Serin, Threonin, Methionin,
10 Cystein, Valin, Leucin, Isoleucin, Arginin, Prolin, Histidin,
Tyrosin; Phenylalanin und Tryptophan.
34. Verfahren zur Herstellung einer Feinchemikalie, umfassend das
Züchten einer Zelle, deren genomische DNA durch Einschluß
15 eines Nukleinsäuremoleküls nach einem der Ansprüche 1-9 ver-
ändert worden ist.
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45

CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM-GENE, DIE PROTEINE CODIEREN, DIE AN DER MEMBRANSYNTHESE UND AM MEMBRANTRANSPORT BETEILIGT SIND

5 Hintergrund der Erfindung

Bestimmte Produkte und Nebenprodukte von natürlich-vorkommenden Stoffwechselprozessen in Zellen werden in vielen Industriezweigen verwendet, einschließlich der Nahrungsmittel-, Futtermittel-,
10 Kosmetik- und pharmazeutischen Industrie. Diese Moleküle, die gemeinsam als "Feinchemikalien" bezeichnet werden, umfassen organische Säuren, sowohl proteinogene als auch nicht-proteinogene Aminosäuren, Nukleotide und Nukleoside, Lipide und Fettsäuren, Diöle, Kohlehydrate, aromatische Verbindungen, Vitamine und Co-
15 faktoren sowie Enzyme. Ihre Produktion erfolgt am besten mittels Anzucht von Bakterien im Großmaßstab, die entwickelt wurden, um große Mengen von einem oder mehreren Molekülen zu produzieren und sezernieren. Ein für diesen Zweck besonders geeigneter Organismus ist *Corynebacterium glutamicum*, ein gram-positives, nicht-patho-
20 genes Bakterium. Über Stammselektion ist eine Reihe von Mutantensstämmen entwickelt worden, die ein Sortiment wünschenswerter Verbindungen produzieren. Die Auswahl von Stämmen, die hinsichtlich der Produktion eines bestimmten Moleküls verbessert sind, ist jedoch ein zeitaufwendiges und schwieriges Verfahren.

25

Zusammenfassung der Erfindung

Diese Erfindung stellt neuartige Nukleinsäuremoleküle bereit, die sich zur Identifizierung oder Klassifizierung von *Corynebacterium*
30 *glutamicum* oder verwandten Bakterienarten verwenden lassen. *C. glutamicum* ist ein gram-positives, aerobes Bakterium, das in der Industrie für die Produktion im Großmaßstab einer Reihe von Feinchemikalien, und auch zum Abbau von Kohlenwasserstoffen (bspw. beim Überlaufen von Rohöl) und zur Oxidation von Terpenoiden ge-
35 meinhin verwendet wird. Die Nukleinsäuremoleküle können daher zum Identifizieren von Mikroorganismen eingesetzt werden, die sich zur Produktion von Feinchemikalien, bspw. durch Fermentationsverfahren, verwenden lassen. *C. glutamicum* selbst ist zwar nicht-pathogen, jedoch ist es mit anderen *Corynebacterium*-Arten, wie *C.*
40 *rynebacterium diphtheriae* (dem Erreger der Diphtherie) verwandt, die bedeutende Pathogene beim Menschen sind. Die Fähigkeit, das Vorhandensein von *Corynebacterium*-Arten zu identifizieren, kann daher auch eine signifikante klinische Bedeutung haben, z.B. bei diagnostischen Anwendungen. Diese Nukleinsäuremoleküle können zu-
45 dem als Bezugspunkte zur Kartierung des *C. glutamicum*-Genoms oder von Genomen verwandter Organismen dienen.

2

- Diese neuen Nukleinsäuremoleküle codieren Proteine, die hier als Membrankonstruktions- und Membrantransport-(MCT)-Proteine bezeichnet werden. Diese MCT-Proteine können bspw. eine Funktion ausüben, die am Stoffwechsel (z.B. Biosynthese oder Abbau) von
- 5 Verbindungen beteiligt ist, die für die Membranbiosynthese notwendig sind, oder den Membrantransport von einer oder mehreren Verbindungen in die Zelle oder aus der Zelle unterstützen. Aufgrund der Verfügbarkeit von Klonierungsvektoren zur Verwendung in *Corynebacterium glutamicum*, wie bspw. offenbart in Sinskey
- 10 et al., US-Patent Nr. 4 649 119, und Techniken zur genetischen Manipulation von *C. glutamicum* und den verwandten *Brevibacterium*-Arten (z.B. *Lactofermentum*) Yoshihama et al., J. Bacteriol. 162 (1985) 591-597; Katsumata et al., J. Bacteriol. 159 (1984) 306-311; und Santamaria et al. J. Gen. Microbiol. 130 (1984)
- 15 2237-2246), lassen sich die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle zur genetischen Manipulation dieses Organismus verwenden, um es als Produzenten von einer oder mehreren Feinchemikalien besser und effizienter zu machen. Die verbesserte Produktion oder Effizienz der Produktion einer Feinchemikalie kann auf einer direkten
- 20 Wirkung der Manipulation eines erfindungsgemäßen Gens oder auf einer indirekten Wirkung dieser Manipulation beruhen.

- Es gibt eine Reihe von Mechanismen, durch die die Veränderung eines erfindungsgemäßen MCT-Proteins die Ausbeute, Produktion und/
- 25 oder die Effizienz der Produktion einer Feinchemikalie aus einem *C. glutamicum*-Stamm, der ein solches verändertes Protein enthält, direkt beeinflussen kann. Diese MCT-Proteine, die am Export der Feinchemikalien-Moleküle aus der Zelle beteiligt sind, können eine größere Anzahl oder höhere Aktivität aufweisen, so daß größere
- 30 Mengen dieser Verbindungen in das extrazelluläre Medium sezerniert werden, aus dem sie leichter gewonnen werden. Diese MCT-Proteine, die am Import der Nährstoffe beteiligt sind, die für die Biosynthese von einer oder mehreren Feinchemikalien (z.B. Phosphat, Sulfat, Stickstoffverbindungen usw.) notwendig sind,
- 35 können eine größere Anzahl oder höhere Aktivität aufweisen, so daß diese Vorstufen, Cofaktoren oder Zwischenverbindungen in der Zelle in höherer Konzentration vorliegen. Zudem sind Fettsäuren und Lipide selbst wünschenswerte Feinchemikalien; durch Optimieren der Aktivität oder Vergrößern der Anzahl von einem oder mehreren
- 40 erfindungsgemäßen MCT-Proteinen, die an der Biosynthese dieser Verbindungen beteiligt sind, oder durch Beeinträchtigen der Aktivität von einem oder mehreren MCT-Proteinen, die am Abbau dieser Verbindungen beteiligt sind, kann man die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion von Fettsäuren und Lipidmolekülen aus *C. glutamicum* steigern.
- 45

3

- Die Mutagenese von einem oder mehreren erfindungsgemäßen MCT-Genen kann auch MCT-Proteine mit veränderten Aktivitäten hervorbringen, die die Produktion von einer oder mehreren gewünschten Feinchemikalien aus *C. glutamicum* indirekt beeinträchtigen. Bspw.
- 5 können erfindungsgemäße MCT-Proteine, die am Export von Abfallprodukten beteiligt sind, eine größere Zahl oder höhere Aktivität aufweisen, so daß die normalen Stoffwechselabfälle der Zelle (aufgrund der Überproduktion der gewünschten Feinchemikalie möglicherweise in höherer Quantität) effizient exportiert werden,
- 10 bevor sie die Nukleotide und Proteine in der Zelle beschädigen können (was die Lebensfähigkeit der Zelle herabsetzen würde) oder mit den Feinchemikalien-Biosynthesewegen wechselwirken können (was die Ausbeute, Produktion oder Effizienz der Produktion einer gewünschten Feinchemikalien senken würde). Die relativ großen in-
- 15 trazellulären Mengen der gewünschten Feinchemikalie können selbst für die Zelle toxisch sein, bspw. kann man durch Vergrößern der Anzahl an Transportern, die diese Verbindungen aus der Zelle exportieren können, die Lebensfähigkeit der Zelle in Kultur steigern, was wiederum bewirkt, daß eine größere Anzahl Zellen in der
- 20 Kultur die gewünschte Feinchemikalie produziert. Die erfindungsgemäßen MCT-Proteine können auch so manipuliert werden, daß die relativen Mengen der unterschiedlichen Lipid- und Fettsäuremoleküle produziert werden. Dies kann eine erhebliche Auswirkung auf die Lipidzusammensetzung der Zellmembran haben. Da jeder Lipidtyp
- 25 unterschiedliche physikalische Eigenschaften aufweist, kann eine Veränderung der Lipidzusammensetzung einer Membran die Membranfluidität signifikant verändern. Änderungen der Membranfluidität können den Transport der Moleküle über die Membran sowie die Integrität der Zelle beeinflussen, was jeweils eine erhebliche Aus-
- 30 wirkung auf die Produktion von Feinchemikalien aus *C. glutamicum* in großangelegten Fermenterkulturen hat.

- Die Erfindung stellt neue Nukleinsäuremoleküle bereit, die Proteine codieren, die hier als MCT-Proteine bezeichnet werden und
- 35 bspw. am Metabolismus von Verbindungen, die für den Aufbau der Zellmembranen in *C. glutamicum* notwendig sind, oder am Transport von Molekülen über diese Membranen beteiligt sind. Das MCT-Protein ist in einer bevorzugten Ausführungsform am Metabolismus von Verbindungen, die für den Aufbau der Zellmembranen in *C. glutami-*
- 40 *cum* nötig sind, oder am Transport von Molekülen über diese Membranen beteiligt. Beispiele für diese Proteine umfassen solche, die von den in Tabelle 1 angegebenen Genen codiert werden.

- Ein Aspekt der Erfindung betrifft folglich isolierte Nukleinsäuremoleküle (bspw. cDNAs), umfassend eine Nukleotidsequenz, die
- 45 ein MCT-Protein oder biologisch aktive Abschnitte davon codiert, sowie Nukleinsäurefragmente, die sich als Primer oder Hybridisie-

4

5 rungssonden zum Nachweisen oder zur Amplifikation von MCT-codierender Nukleinsäure (bspw. DNA oder mRNA) eignen. Bei besonders bevorzugten Ausführungsformen umfaßt das isolierte Nukleinsäuremolekül eine der in Anhang A aufgeführten Nukleotidsequenzen oder
10 den codierenden Bereich oder ein Komplement davon von einer dieser Nukleotidsequenzen. In anderen besonders bevorzugten Ausführungsformen umfaßt das erfindungsgemäße isolierte Nukleinsäuremolekül eine Nukleotidsequenz, die an eine in Anhang A angegebene Nukleotidsequenz oder einen Abschnitt davon hybridisiert oder
15 mindestens zu etwa 50%, vorzugsweise mindestens zu etwa 60%, stärker bevorzugt mindestens etwa 70%, 80% oder 90% und noch stärker bevorzugt mindestens etwa 95%, 96%, 97%, 98%, 99% oder noch homologer dazu ist. In anderen bevorzugten Ausführungsformen codiert das isolierte Nukleinsäuremolekül eine der in Anhang B
20 aufgeführten Aminosäuresequenzen. Die bevorzugten erfindungsgemäßen MCT-Proteine besitzen ebenfalls vorzugsweise mindestens eine der hier beschriebenen MCT-Aktivitäten.

Bei einer weiteren Ausführungsform codiert das isolierte Nukleinsäuremoleküle ein Protein oder einen Abschnitt davon, wobei das
25 Protein oder sein Abschnitt eine Aminosäuresequenz enthält, die zu einer Aminosäuresequenz in Anhang B hinreichend homolog ist, bspw. zu einer Aminosäuresequenz in Anhang B derart hinreichend homolog ist, daß das Protein oder sein Abschnitt eine MCT-Aktivität behält. Vorzugsweise kann das von dem Nukleinsäuremolekül codierte Protein oder der Abschnitt davon weiterhin die Fähigkeit behalten, am Metabolismus von Verbindungen teilzunehmen, die für den Aufbau der Zellmembranen von *C. glutamicum* oder den Transport von Molekülen über diese Membranen nötig sind. Bei einer Ausführungsform ist das von dem Nukleinsäuremolekül codierte Protein
30 mindestens etwa 50%, vorzugsweise mindestens etwa 60% und stärker bevorzugt mindestens etwa 70%, 80% oder 90% und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% oder noch homologer zu einer Aminosäuresequenz in Anhang B (bspw. eine vollständige Aminosäuresequenz, ausgewählt aus den in Anhang B genannten Sequenzen). Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das Protein ein *C. glutamicum*-Vollängenprotein, das zu einer vollständigen Aminosäuresequenz in Anhang B (die von dem in Anhang A gezeigten offenen Leseraster codiert wird) im wesentlichen homolog ist.
40

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform stammt das isolierte Nukleinsäuremolekül aus *C. glutamicum* und codiert ein Protein (z.B. ein MCT-Fusionsprotein), das eine zu einer der Aminosäuresequenzen in Anhang B zumindest etwa 50% oder stärker homologe biologisch aktive Domäne umfaßt, und am Metabolismus von Verbindungen, die für den Aufbau der Zellmembran nötig sind, und
45

5

am Transport von Molekülen über diese Membran beteiligt ist, oder eine oder mehrere der in Tabelle 1 angegebenen Aktivitäten aufweist und enthält ebenfalls heterologe Nukleinsäuresequenzen, die ein heterologes Polypeptid oder regulatorische Bereiche codieren.

5

Bei einer weiteren Ausführungsform ist das isolierte Nukleinsäuremolekül mindestens 15 Nukleotide lang und hybridisiert unter stringenten Bedingungen an ein Nukleinsäuremolekül, das eine Nukleotidsequenz aus Anhang A umfaßt. Das isolierte Nukleinsäuremolekül entspricht vorzugsweise einem natürlich vorkommenden Nukleinsäuremolekül. Die isolierte Nukleinsäure codiert stärker bevorzugt ein natürlich vorkommendes *C. glutamicum*-MCT-Protein oder einen biologisch aktiven Abschnitt davon.

15 Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Vektoren, bspw. rekombinante Expressionsvektoren, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle enthalten, und Wirtszellen, in die diese Vektoren eingebracht worden sind. Bei einer Ausführungsform wird zur Herstellung eines MCT-Proteins eine Wirtszelle verwendet, die 20 in einem geeigneten Medium gezüchtet wird. Das MCT-Protein kann dann aus dem Medium oder der Wirtszelle isoliert werden.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft einen genetisch veränderten Mikroorganismus, bei dem ein MCT-Gen eingebracht oder verändert worden ist. Das Genom des Mikroorganismus ist bei einer 25 Ausführungsform durch Einbringen eines erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküls verändert worden, das die MCT-Wildtyp- oder die mutierte MCT-Sequenz als Transgen codiert. Bei einer anderen Ausführungsform ist ein endogenes MCT-Gen im Genom des Mikroorganismus durch homologe Rekombination mit einem veränderten MCT-Gen 30 verändert, z.B. funktionell disrupiert, worden. Der Mikroorganismus gehört bei einer bevorzugten Ausführungsform zur Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium*, wobei *Corynebacterium glutamicum* besonders bevorzugt ist. Der Mikroorganismus wird in einer 35 bevorzugten Ausführungsform auch zur Herstellung einer gewünschten Verbindung, wie einer Aminosäure, besonders bevorzugt Lysin, verwendet.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein isoliertes MCT-Protein oder einen Abschnitt, bspw. einen biologisch aktiven Abschnitt davon. Das isolierte MCT-Protein oder sein Abschnitt kann in einer bevorzugten Ausführungsform am Metabolismus von Verbindungen, die für den Aufbau der Zellmembranen in *C. glutamicum* 40 notwendig sind, oder am Transport von Molekülen über die Membranen beteiligt sein. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das isolierte MCT-Protein oder ein Abschnitt davon hinreichend homolog zu einer Aminosäuresequenz von Anhang B, so daß 45

6

das Protein oder sein Abschnitt weiterhin am Metabolismus von Verbindungen, die für den Aufbau der Zellmembranen in *C. glutamicum* notwendig sind, oder am Transport von Molekülen über die Membranen beteiligt sein kann.

5

Die Erfindung betrifft zudem ein isoliertes MCT-Proteinpräparat. Das MCT-Protein umfaßt bei bevorzugten Ausführungsformen eine Aminosäuresequenz aus Anhang B. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung ein isoliertes Vollängen-

- 10 protein, das zu einer vollständigen Aminosäuresequenz aus Anhang B (welche von einem offenen Leseraster in Anhang A codiert wird) im wesentlichen homolog ist. Bei einer weiteren Ausführungsform ist das Protein mindestens zu etwa 50%, vorzugsweise mindestens zu etwa 60%, stärker bevorzugt mindestens etwa 70%, 80% oder 90%
- 15 und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 95%, 96%, 97%, 98%, oder 99% oder noch homologer zu einer vollständigen Aminosäuresequenz aus Anhang B. Das isolierte MCT-Protein umfaßt bei anderen Ausführungsformen eine Aminosäuresequenz, die zu mindestens etwa 50% oder mehr zu einer der Aminosäuresequenzen aus Anhang B
- 20 homolog ist und am Metabolismus von Verbindungen, die für den Aufbau der Zellmembranen in *C. glutamicum* notwendig sind, oder am Transport von Molekülen über die Membranen beteiligt sein kann, oder eine oder mehrere der in Tabelle 1 angegebenen Aktivitäten hat.

25

Das isolierte MCT-Protein kann alternativ eine Aminosäuresequenz umfassen, die von einer Nukleotidsequenz codiert wird, welche mit einer Nukleotidsequenz aus Anhang B, bspw. unter stringenten Bedingungen, hybridisiert oder mindestens zu etwa 50%, vorzugsweise

30 mindestens zu etwa 60%, stärker bevorzugt mindestens etwa 70%, 80% oder 90% und noch stärker bevorzugt mindestens etwa 95%, 96%, 97%, 98% oder 99% oder noch homologer dazu ist. Bevorzugte Formen der MCT-Proteine haben ebenfalls vorzugsweise eine oder mehrere der hier beschriebenen MCT-Bioaktivitäten.

35

Das MCT-Polypeptid oder ein biologisch aktiver Abschnitt davon kann mit einem Nicht-MCT-Polypeptid funktionsfähig verbunden werden, damit ein Fusionsprotein entsteht. Dieses Fusionsprotein hat bei bevorzugten Ausführungsformen eine andere Aktivität als das

40 MCT-Protein allein und ergibt bei anderen bevorzugten Ausführungsformen erhöhte Ausbeuten, eine erhöhte Produktion und/oder Effizienz der Produktion einer gewünschten Feinchemikalie aus *C. glutamicum*. Die Integration dieses Fusionsproteins in eine Wirtszelle moduliert bei besonders bevorzugten Ausführungsformen die

45 Produktion einer gewünschten Verbindung von der Zelle.

7

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer Feinchemikalie. Das Verfahren sieht die Anzucht einer Zelle vor, die einen Vektor enthält, der die Expression eines erfindungsgemäßen MCT-Nukleinsäuremoleküls bewirkt, so daß
5 eine Feinchemikalie produziert wird. Dieses Verfahren umfaßt bei einer bevorzugten Ausführungsform zudem den Schritt der Gewinnung einer Zelle, die einen solchen Vektor enthält, wobei die Zelle mit einem Vektor transfiziert ist, der die Expression einer MCT-Nukleinsäure bewirkt. Dieses Verfahren umfaßt bei einer weiteren
10 bevorzugten Ausführungsform zudem den Schritt, bei dem die Feinchemikalie aus der Kultur gewonnen wird. Die Zelle gehört bei einer bevorzugten Ausführungsform zur Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* oder wird aus den in Tabelle 3 angegebenen Stämmen ausgewählt.

15

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Verfahren zur Modulation der Produktion eines Moleküls aus einem Mikroorganismus. Diese Verfahren umfassen das Zusammenbringen der Zelle mit einer Substanz, die die MCT-Proteinaktivität oder die MCT-Nukleinsäure-
20 Expression moduliert, so daß eine zellassoziierte Aktivität verglichen mit der gleichen Aktivität bei Fehlen der Substanz verändert wird. Die Zelle wird bei einer bevorzugten Ausführungsform hinsichtlich eines oder mehrerer *C. glutamicum*-Stoffwechselwege für Zellmembrankomponenten oder hinsichtlich des Transports von
25 Verbindungen über die Membranen moduliert, so daß die Ausbeuten oder die Produktionsrate einer gewünschten Feinchemikalie durch diesen Mikroorganismus verbessert werden. Die Substanz, die die MCT-Proteinaktivität moduliert, stimuliert bspw. die MCT-Proteinaktivität oder die MCT-Nukleinsäure-Expression. Beispiele von
30 Substanzen, die die MCT-Proteinaktivität oder die MCT-Nukleinsäureexpression stimulieren, umfassen kleine Moleküle, aktive MCT-Proteine und Nukleinsäuren, die MCT-Proteine codieren und in die Zelle eingebracht worden sind. Beispiele von Substanzen, die die MCT-Aktivität oder -Expression hemmen, umfassen kleine Moleküle
35 und Antisense-MCT-Nukleinsäuremoleküle.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Verfahren zur Modulation der Ausbeuten einer gewünschten Verbindung aus einer Zelle, umfassend das Einbringen eines MCT-Wildtyp- oder -Mutantengens in
40 eine Zelle, das entweder auf einem gesonderten Plasmid bleibt oder in das Genom der Wirtszelle integriert wird. Die Integration in das Genom kann zufallsgemäß oder durch homologe Rekombination erfolgen, so daß das native Gen durch die integrierte Kopie ersetzt wird, was die Produktion der gewünschten Verbindung aus der
45 zu modulierenden Zelle hervorruft. Diese Ausbeuten sind bei einer bevorzugten Ausführungsform erhöht. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist die Chemikalie eine Feinchemikalie, die

8

in einer besonders bevorzugten Ausführungsform eine Aminosäure ist. Diese Aminosäure ist in einer besonders bevorzugten Ausführungsform L-Lysin.

5 Eingehende Beschreibung der Erfindung

- Die vorliegende Erfindung stellt MCT-Nukleinsäure- und -Proteinmoleküle bereit, die am Metabolismus von Verbindungen, die für den Aufbau der Zellmembranen in *C. glutamicum* notwendig sind, oder am Transport von Molekülen über die Membranen beteiligt sein können. Die erfindungsgemäßen Moleküle lassen sich bei der Modulation der Produktion von Feinchemikalien von Mikroorganismen, wie *C. glutamicum*, verwenden, und zwar entweder direkt (z.B. wo die Überexpression oder Optimierung eines Fettsäurebiosyntheseproteins eine direkte Auswirkung auf die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion der Fettsäure von modifiziertem *C. glutamicum* hat) oder durch eine mögliche indirekte Auswirkung, die trotzdem einen Anstieg der Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion der gewünschten Verbindung bewirkt (z.B. wo die Modulation des Metabolismus der Zellmembrankomponenten Veränderungen der Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion oder der Zusammensetzung der Zellmembran bewirkt, was wiederum die Produktion von einer oder mehreren Feinchemikalien beeinflusst). Die erfindungsgemäßen Aspekte werden nachstehend weiter erläutert.

I. Feinchemikalien

- Der Begriff "Feinchemikalie" ist im Fachgebiet bekannt und beinhaltet Moleküle, die von einem Organismus produziert werden und in verschiedenen Industriezweigen Anwendungen finden, wie bspw., jedoch nicht beschränkt auf die pharmazeutische Industrie, die Landwirtschafts-, und Kosmetik-Industrie. Diese Verbindungen umfassen organische Säuren, wie Weinsäure, Itaconsäure und Diaminopimelinsäure, sowohl proteinogene als auch nicht-proteinogene Aminosäuren, Purin- und Pyrimidinbasen, Nukleoside und Nukleotide (wie bspw. beschrieben in Kuninaka, A. (1996) Nucleotides and related compounds, S. 561-612, in Biotechnology Bd. 6, Rehm et al., Hrsg. VCH: Weinheim und den darin enthaltenen Zitaten), Lipide, gesättigte und ungesättigte Fettsäuren (bspw. Arachidonsäure), Diole (bspw. Propandiol und Butandiol), Kohlenhydrate (bspw. Hyaluronsäure und Trehalose), aromatische Verbindungen (bspw. aromatische Amine, Vanillin und Indigo), Vitamine und Cofaktoren (wie beschrieben in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A27, "Vitamins", S. 443-613 (1996) VCH: Weinheim und den darin enthaltenen Zitaten; und Ong, A.S., Niki, E. und Packer, L. (1995) "Nutrition, Lipids, Health and Disease"

Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia and the Society for Free Radical Research - Asien, abgehalten am 1.-3. Sept. 1994 in Penang, Malaysia, AOCS Press (1995)), Enzyme und sämtliche anderen
5 von Gutcho (1983) in Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation, ISBN: 0818805086 und den darin angegebenen Literaturstellen, beschriebenen Chemikalien. Der Metabolismus und die Verwendungen bestimmter Feinchemikalien sind nachstehend weiter erläutert.

10

A. Aminosäure-Metabolismus und Verwendungen

Die Aminosäuren umfassen die grundlegenden Struktureinheiten sämtlicher Proteine und sind somit für die normalen Zellfunktionen
15 essenziell. Der Begriff "Aminosäure" ist im Fachgebiet bekannt. Die proteinogenen Aminosäuren, von denen es 20 Arten gibt, dienen als Struktureinheiten für Proteine, in denen sie über Peptidbindungen miteinander verknüpft sind, wohingegen die nicht-proteinogenen Aminosäuren (von denen Hunderte bekannt sind) ge-
20 wöhnlich nicht in Proteinen vorkommen (siehe Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A2, S. 57-97 VCH: Weinheim (1985)). Die Aminosäuren können in der D- oder L-Konfiguration vorliegen, obwohl L-Aminosäuren gewöhnlich der einzige Typ sind, den man in natürlich vorkommenden Proteinen vorfindet. Biosyn-
25 these- und Abbauwege von jeder der 20 proteinogenen Aminosäuren sind sowohl bei prokaryotischen als auch eukaryotischen Zellen gut charakterisiert (siehe bspw. Stryer, L. Biochemistry, 3. Auflage, S. 578-590 (1988)). Die "essentiellen" Aminosäuren (Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Threo-
30 nin, Tryptophan und Valin), so bezeichnet, da sie aufgrund der Komplexität ihrer Biosynthesen mit der Ernährung aufgenommen werden müssen, werden durch einfache Biosynthesewege in die übrigen 11 "nichtessentiellen" Aminosäuren (Alanin, Arginin, Asparagin, Aspartat, Cystein, Glutamat, Glutamin, Glycin, Prolin, Serin und
35 Tyrosin) umgewandelt. Höhere Tiere besitzen die Fähigkeit, einige dieser Aminosäuren zu synthetisieren, jedoch müssen die essentiellen Aminosäuren mit der Nahrung aufgenommen werden, damit eine normale Proteinsynthese stattfindet.

40 Abgesehen von ihrer Funktion bei der Proteinbiosynthese sind diese Aminosäuren interessante Chemikalien an sich, und man hat entdeckt, daß viele bei verschiedenen Anwendungen in der Nahrungsmittel-, Futter-, Chemie-, Kosmetik-, Landwirtschafts- und pharmazeutischen Industrie zum Einsatz kommen. Lysin ist nicht
45 nur für die Ernährung des Menschen eine wichtige Aminosäure, sondern auch für monogastrische Tiere, wie Geflügel und Schweine. Glutamat wird am häufigsten als Geschmacksadditiv (Mononatrium-

10

- glutamat, MSG) sowie weithin in der Nahrungsmittelindustrie verwendet, wie auch Aspartat, Phenylalanin, Glycin und Cystein. Glycin, L-Methionin und Tryptophan werden sämtlich in der pharmazeutischen Industrie verwendet. Glutamin, Valin, Leucin, Isoleucin, Histidin, Arginin, Prolin, Serin und Alanin werden in der pharmazeutischen Industrie und der Kosmetikindustrie verwendet. Threonin, Tryptophan und D-/L-Methionin sind weitverbreitete Futtermittelzusätze (Leuchtenberger, W. (1996) Amino acids - technical production and use, S. 466-502 in Rehm et al., (Hrsg.) Biotechnology Bd. 6, Kapitel 14a, VCH: Weinheim). Man hat entdeckt, daß sich diese Aminosäuren außerdem als Vorstufen für die Synthese von synthetischen Aminosäuren und Proteinen, wie N-Acetylcystein, S-Carboxymethyl-L-cystein, (S)-5-Hydroxytryptophan und anderen, in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A2, S. 57-97, VCH, Weinheim, 1985 beschriebenen Substanzen eignen.

- Die Biosynthese dieser natürlichen Aminosäuren in Organismen, die sie produzieren können, bspw. Bakterien, ist gut charakterisiert worden (für einen Überblick der bakteriellen Aminosäure-Biosynthese und ihrer Regulation, s. Umbarger, H.E. (1978) Ann. Rev. Biochem. 47: 533 - 606). Glutamat wird durch reduktive Aminierung von α -Ketoglutarat, einem Zwischenprodukt im Citronensäure-Zyklus, synthetisiert. Glutamin, Prolin und Arginin werden jeweils nacheinander aus Glutamat erzeugt. Die Biosynthese von Serin erfolgt in einem Dreischritt-Verfahren und beginnt mit 3-Phosphoglycerat (einem Zwischenprodukt bei der Glykolyse), und ergibt nach Oxidations-, Transaminierungs- und Hydrolyseschritten diese Aminosäure. Cystein und Glycin werden jeweils aus Serin produziert, und zwar die erstere durch Kondensation von Homocystein mit Serin, und die letztere durch Übertragung des Seitenketten- β -Kohlenstoffatoms auf Tetrahydrofolat, in einer durch Serintranshydroxymethylase katalysierten Reaktion. Phenylalanin und Tyrosin werden aus den Vorstufen des Glycolyse- und Pentosephosphatweges, Erythrose-4-phosphat und Phosphoenolpyruvat in einem 9-Schritt-Biosyntheseweg synthetisiert, der sich nur in den letzten beiden Schritten nach der Synthese von Prephenat unterscheidet. Tryptophan wird ebenfalls aus diesen beiden Ausgangsmolekülen produziert, jedoch erfolgt dessen Synthese in einem 11-Schritt-Weg. Tyrosin läßt sich in einer durch Phenylalaninhydroxylase katalysierten Reaktion auch aus Phenylalanin herstellen. Alanin, Valin und Leucin sind jeweils Biosyntheseprodukte aus Pyruvat, dem Endprodukt der Glykolyse. Aspartat wird aus Oxalacetat, einem Zwischenprodukt des Citratzyklus, gebildet. Asparagin, Methionin, Threonin und Lysin werden jeweils durch Umwandlung von Aspartat produziert. Isoleucin wird aus Threonin gebildet. In einem komplexen 9-Schritt-Weg erfolgt die Bildung von

11

Histidin aus 5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat, einem aktivierten Zucker.

- Aminosäuren, deren Menge den Proteinbiosynthesebedarf der Zelle übersteigt, können nicht gespeichert werden, und werden stattdessen abgebaut, so daß Zwischenprodukte für die Haupt-Stoffwechselwege der Zelle bereitgestellt werden (für einen Überblick siehe Stryer, L., Biochemistry, 3. Aufl. Kap. 21 "Amino Acid Degradation and the Urea Cycle"; S 495-516 (1988)). Die Zelle ist zwar in der Lage, ungewünschte Aminosäuren in nützliche Stoffwechsel-Zwischenprodukte umzuwandeln, jedoch ist die Aminosäureproduktion hinsichtlich der Energie, der Vorstufenmoleküle und der für ihre Synthese nötigen Enzyme aufwendig. Es überrascht daher nicht, daß die Aminosäure-Biosynthese durch Feedback-Hemmung reguliert wird, wobei das Vorliegen einer bestimmten Aminosäure ihre eigene Produktion verlangsamt oder ganz beendet (für einen Überblick über den Rückkopplungs-Mechanismus bei Aminosäure-Biosynthesewegen, siehe Stryer, L., Biochemistry, 3. Aufl., Kap. 24, "Biosynthesis of Amino Acids and Heme", S. 575-600 (1988)). Der Ausstoß einer bestimmten Aminosäure wird daher durch die Menge dieser Aminosäure in der Zelle eingeschränkt.

B. Vitamine, Cofaktoren und Nutrazeutika-Metabolismus sowie Verwendungen

- Vitamine, Cofaktoren und Nutrazeutika umfassen eine weitere Gruppe von Molekülen. Höhere Tiere haben die Fähigkeit verloren, diese zu synthetisieren und müssen sie somit aufnehmen, obwohl sie leicht durch andere Organismen, wie Bakterien, synthetisiert werden. Diese Moleküle sind entweder biologisch aktive Moleküle an sich oder Vorstufen von biologisch aktiven Substanzen, die als Elektronenträger oder Zwischenprodukte bei einer Reihe von Stoffwechselwegen dienen. Diese Verbindungen haben neben ihrem Nährwert auch einen signifikanten industriellen Wert als Farbstoffe, Antioxidantien und Katalysatoren oder andere Verarbeitungs-Hilfsstoffe. (Für einen Überblick über die Struktur, Aktivität und die industriellen Anwendungen dieser Verbindungen siehe bspw. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, "Vitamins", Bd. A27, S. 443-613, VCH: Weinheim, 1996). Der Begriff "Vitamin" ist im Fachgebiet bekannt und umfaßt Nährstoffe, die von einem Organismus für eine normale Funktion benötigt werden, jedoch nicht von diesem Organismus selbst synthetisiert werden können. Die Gruppe der Vitamine kann Cofaktoren und nutrazeutische Verbindungen umfassen. Der Begriff "Cofaktor" umfaßt nicht-proteinartige Verbindungen, die für das Auftreten einer normalen Enzymaktivität nötig sind. Diese Verbindungen können organisch oder anorganisch sein; die erfindungsgemäßen Cofaktor-Moleküle sind vorzugsweise orga-

12

nisch. Der Begriff "Nutrazeutikum" umfaßt Nahrungsmittelzusätze, die bei Pflanzen und Tieren, insbesondere dem Menschen, gesundheitsfördernd sind. Beispiele solcher Moleküle sind Vitamine, Antioxidantien und ebenfalls bestimmte Lipide (z.B. mehrfach ungesättigte Fettsäuren).

- Die Biosynthese dieser Moleküle in Organismen, die zu ihrer Produktion befähigt sind, wie Bakterien, ist umfassend charakterisiert worden (Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, "Vitamins", Bd. A27, S. 443-613, VCH: Weinheim, 1996, Michal, G. (1999) Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, John Wiley & Sons; Ong, A.S., Niki, E. und Packer, L. (1995) "Nutrition, Lipids, Health and Disease" Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia and the Society for free Radical Research - Asien, abgehalten am 1.-3. Sept. 1994 in Penang, Malaysia, AOCS Press, Champaign, IL X, 374 S).

- Thiamin (Vitamin B₁) wird durch chemisches Kuppeln von Pyrimidin und Thiazol-Einheiten gebildet. Riboflavin (Vitamin B₂) wird aus Guanosin-5'-triphosphat (GTP) und Ribose-5'-phosphat synthetisiert. Riboflavin wiederum wird zur Synthese von Flavinmononukleotid (FMN) und Flavinadenindinukleotid (FAD) eingesetzt. Die Familie von Verbindungen, die gemeinsam als "Vitamin B₆" bezeichnet werden (bspw. Pyridoxin, Pyridoxamin, Pyridoxal-5'-phosphat und das kommerziell verwendete Pyridoxinhydrochlorid), sind alle Derivate der gemeinsamen Struktureinheit 5-Hydroxy-6-methylpyridin. Panthothenat (Pantothenensäure, R-(+)-N-(2,4-Dihydroxy-3,3-dimethyl-1-oxobutyl)-β-alanin) kann entweder durch chemische Synthese oder durch Fermentation hergestellt werden. Die letzten Schritte bei der Panthothenat-Biosynthese bestehen aus der ATP-getriebenen Kondensation von β-Alanin und Pantoinsäure. Die für die Biosyntheseschritte für die Umwandlung in Pantoinsäure, in β-Alanin und zur Kondensation in Pantothenensäure verantwortlichen Enzyme sind bekannt. Die metabolisch aktive Form von Panthothenat ist Coenzym A, dessen Biosynthese über 5 enzymatische Schritte verläuft. Panthothenat, Pyridoxal-5'-phosphat, Cystein und ATP sind die Vorstufen von Coenzym A. Diese Enzyme katalysieren nicht nur die Bildung von Panthothenat, sondern auch die Produktion von (R)-Pantoinsäure, (R)-Pantolacton, (R)-Panthenol (Provitamin B₅), Pantethein (und seinen Derivaten) und Coenzym A.

- Die Biosynthese von Biotin aus dem Vorstufenmolekül Pimeloyl-CoA in Mikroorganismen ist ausführlich untersucht worden, und man hat mehrere der beteiligten Gene identifiziert. Es hat sich herausgestellt, daß viele der entsprechenden Proteine an der Fe-Cluster-Synthese beteiligt sind und zu der Klasse der nifS-Proteine gehö-

13

ren. Die Liponsäure wird von der Octanonsäure abgeleitet und dient als Coenzym beim Energie-Metabolismus, wo sie Bestandteil des Pyruvatdehydrogenasekomplexes und des α -Ketoglutaratdehydrogenasekomplexes wird. Die Folate sind eine Gruppe von Substanzen, die alle von der Folsäure abgeleitet werden, die wiederum von L-Glutaminsäure, p-Aminobenzoesäure und 6-Methylpterin hergeleitet ist. Die Biosynthese der Folsäure und ihrer Derivate, ausgehend von den metabolischen Stoffwechselzwischenprodukten Guanosin-5'-triphosphat (GTP), L-Glutaminsäure und p-Aminobenzoesäure ist in bestimmten Mikroorganismen eingehend untersucht worden.

Corrinoide (wie die Cobalamine und insbesondere Vitamin B₁₂) und die Porphyrine gehören zu einer Gruppe von Chemikalien, die sich durch ein Tetrapyrrol-Ringsystem auszeichnen. Die Biosynthese von Vitamin B₁₂ ist hinreichend komplex, daß sie noch nicht vollständig charakterisiert worden ist, jedoch ist inzwischen ein Großteil der beteiligten Enzyme und Substrate bekannt. Nikotinsäure (Nikotinat) und Nikotinamid sind Pyridin-Derivate, die auch als "Niacin" bezeichnet werden. Niacin ist die Vorstufe der wichtigen Coenzyme NAD (Nikotinamidadenindinukleotid) und NADP (Nikotinamidadenindinukleotidphosphat) und ihrer reduzierten Formen.

Die Produktion dieser Verbindungen im Großmaßstab beruht größtenteils auf zellfreien chemischen Synthesen, obwohl einige dieser Chemikalien ebenfalls durch großangelegte Anzucht von Mikroorganismen produziert worden sind, wie Riboflavin, Vitamin B₆, Pantothenat und Biotin. Nur Vitamin B₁₂ wird aufgrund der Komplexität seiner Synthese lediglich durch Fermentation produziert. In-vitro-Verfahren erfordern einen erheblichen Aufwand an Materialien und Zeit und häufig an hohen Kosten.

C. *Purin-, Pyrimidin-, Nukleosid- und Nukleotid-Metabolismus und Verwendungen*

Gene für den Purin- und Pyrimidin-Stoffwechsel und ihre entsprechenden Proteine sind wichtige Ziele für die Therapie von Tumorerkrankungen und Virusinfektionen. Der Begriff "Purin" oder "Pyrimidin" umfaßt stickstoffhaltige Basen, die Bestandteil der Nukleinsäuren, Coenzyme und Nukleotide sind. Der Begriff "Nukleotid" beinhaltet die grundlegenden Struktureinheiten der Nukleinsäuremoleküle, die eine stickstoffhaltige Base, einen Pentose-Zucker (bei RNA ist der Zucker Ribose, bei DNA ist der Zucker D-Desoxyribose) und Phosphorsäure umfassen. Der Begriff "Nukleosid" umfaßt Moleküle, die als Vorstufen von Nukleotiden dienen, die aber im Gegensatz zu den Nukleotiden keine Phosphorsäureeinheit aufweisen. Durch Hemmen der Biosynthese dieser Moleküle oder ihrer Mobilisation zur Bildung von Nukleinsäuremolekülen ist es

14

möglich, die RNA- und DNA-Synthese zu hemmen; wird diese Aktivität zielgerichtet bei kanzerogenen Zellen gehemmt, läßt sich die Teilungs- und Replikations-Fähigkeit von Tumorzellen hemmen. Es gibt zudem Nukleotide, die keine Nukleinsäuremoleküle bilden, jedoch als Energiespeicher (d.h. AMP) oder als Coenzyme (d.h. FAD und NAD) dienen.

Mehrere Veröffentlichungen haben die Verwendung dieser Chemikalien für diese medizinischen Indikationen beschrieben, wobei der Purin- und/oder Pyrimidin-Metabolismus beeinflusst wird (bspw. Christopherson, R.I. und Lyons, S.D. (1990) "Potent inhibitors of de novo pyrimidine and purine biosynthesis as chemotherapeutic agents", Med. Res. Reviews 10: 505-548). Untersuchungen an Enzymen, die am Purin- und Pyrimidin-Metabolismus beteiligt sind, haben sich auf die Entwicklung neuer Medikamente konzentriert, die bspw. als Immunsuppressionsmittel oder Antiproliferantien verwendet werden können (Smith, J.L. "Enzymes in Nucleotide Synthesis" Curr. Opin. Struct. Biol. 5 (1995) 752-757; Biochem. Soc. Transact. 23 (1995) 877-902). Die Purin- und Pyrimidinbasen, Nukleoside und Nukleotide haben jedoch auch andere Einsatzmöglichkeiten: als Zwischenprodukte bei der Biosynthese verschiedener Feinchemikalien (z.B. Thiamin, S-Adenosyl-methionin, Folate oder Riboflavin), als Energieträger für die Zelle (bspw. ATP oder GTP) und für Chemikalien selbst, werden gewöhnlich als Geschmacksverstärker verwendet (bspw. IMP oder GMP) oder für viele medizinische Anwendungen (siehe bspw. Kuninaka, A., (1996) "Nucleotides and Related Compounds in Biotechnology Bd. 6, Rehm et al., Hrsg. VCH: Weinheim, S. 561-612). Enzyme, die am Purin-, Pyrimidin-, Nukleosid- oder Nukleotid-Metabolismus beteiligt sind, dienen auch immer stärker als Ziele, gegen die Chemikalien für den Pflanzenschutz, einschließlich Fungiziden, Herbiziden und Insektiziden entwickelt werden.

Der Metabolismus dieser Verbindungen in Bakterien ist charakterisiert worden (für Übersichten siehe bspw. Zalkin, H. und Dixon, J.E. (1992) "De novo purin nucleotide biosynthesis" in Progress in Nucleic Acids Research and Molecular biology, Bd. 42, Academic Press, S. 259-287; und Michal, G. (1999) "Nucleotides and Nucleosides"; Kap. 8 in : Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, Wiley, New York). Der Purin-Metabolismus, das Objekt intensiver Forschung, ist für das Funktionieren der Zelle essentiell. Ein gestörter Purin-Metabolismus in höheren Tieren kann schwere Erkrankungen verursachen, bspw. Gicht. Die Purinnukleotide werden über eine Reihe von Schritten über die Zwischenverbindung Inosin-5'-phosphat (IMP) aus Ribose-5-phosphat synthetisiert, was zur Produktion von Guanosin-5'-monophosphat (GMP) oder Adenosin-5'-monophosphat (AMP)

15

- führt, aus denen sich die als Nukleotide verwendeten Triphosphat-formen leicht herstellen lassen. Diese Verbindungen werden auch als Energiespeicher verwendet, so daß ihr Abbau Energie für viele verschiedene biochemische Prozesse in der Zelle liefert. Die
- 5 Pyrimidinbiosynthese erfolgt über die Bildung von Uridin-5'-mono-phosphat (UMP) aus Ribose-5-phosphat. UMP wiederum wird in Cytidin-5'-triphosphat (CTP) umgewandelt. Die Desoxyformen sämtlicher Nukleotide werden in einer Einschnitt-Reduktionsreaktion aus der Diphosphat-Riboseform des Nukleotides zur Diphosphat-Desoxy-
- 10 riboseform des Nukleotides hergestellt. Nach der Phosphorylierung können diese Moleküle an der DNA-Synthese teilnehmen.

D. Trehalose-Metabolismus und Verwendungen

- 15 Trehalose besteht aus zwei Glucosemolekülen, die über α, α -1,1-Bindung miteinander verknüpft sind. Sie wird gewöhnlich in der Nahrungsmittelindustrie als Süßstoff, als Additiv für getrocknete oder gefrorene Nahrungsmittel sowie in Getränken verwendet. Sie wird jedoch auch in der pharmazeutischen Industrie,
- 20 der Kosmetik- und Biotechnologie-Industrie angewendet (s. bspw. Nishimoto et al., (1998) US-Patent Nr. 5 759 610; Singer, M.A. und Lindquist, S. Trends Biotech. 16 (1998) 460-467; Paiva, C.L.A. und Panek, A.D. Biotech Ann. Rev. 2 (1996) 293-314; und Shiosaka, M. J. Japan 172 (1997) 97-102). Trehalose wird durch
- 25 Enzyme von vielen Mikroorganismen produziert und auf natürliche Weise in das umgebende Medium abgegeben, aus dem sie durch im Fachgebiet bekannte Verfahren gewonnen werden kann.

II. Membran-Biosynthese und Transmembran-Transport

30

- Die Zellmembranen dienen in einer Zelle einer Reihe von Funktionen. Zuerst differenziert eine Membran den Zellinhalt von der Umgebung, so daß die Zelle Integrität erhält. Die Membranen dienen auch als Schranken, damit gefährliche oder ungewünschte
- 35 Verbindungen nicht einströmen können und gewünschte Verbindungen nicht ausströmen können. Zellmembranen sind aufgrund ihrer Struktur von Natur aus gegenüber der nicht erleichterten Diffusion hydrophiler Verbindungen, wie Proteine, Wassermolekülen und Ionen undurchlässig: eine Doppelschicht aus Lipidmolekülen, in der die
- 40 polaren Kopfgruppen nach außen ragen (aus der Zelle heraus bzw. ins Zellinnere hinein) und die unpolaren Schwänze zur Mitte der Doppelschicht ragen und einen hydrophoben Kern bilden (für einen allgemeinen Überblick über die Struktur und Funktion der Membran siehe Gennis, R.B. (1989) Biomembranes, Molecular Structure and
- 45 Function, Springer: Heidelberg). Diese Schranke ermöglicht, daß die Zellen eine relativ höhere Konzentration an gewünschten Verbindungen und eine relativ kleinere Konzentration an ungewünsch-

16

ten Verbindungen als das umgebende Medium enthält, da die Diffusion dieser Verbindungen durch die Membran effizient blockiert wird.

- 5 Die Membran liefert jedoch auch eine wirksame Schranke gegenüber dem Import von gewünschten Molekülen und dem Export von Abfallmolekülen. Zur Bewältigung dieser Schwierigkeit enthalten die Zellmembranen viele Arten von Transporterproteinen, die den Transmembrantransport verschiedenartiger Verbindungen erleichtern
- 10 können: Poren oder Kanäle und Transporter. Die ersteren sind integrale Membranproteine, gelegentlich Proteinkomplexe, die eine regulierte Öffnung durch die Membran bilden. Diese Regulation oder dieses "Gating" ist gewöhnlich für die durch die Pore oder den Kanal zu transportierenden spezifisch, so daß diese Trans-
- 15 membrankonstrukte für eine spezifische Klasse von Substraten spezifisch sind; bspw. ist ein Kaliumkanal derart konstruiert, daß nur Ionen mit ähnlicher Ladung und Größe wie Kalium hindurchgelangen können. Kanal- und Porenproteine haben bestimmte hydrophobe und hydrophile Domänen, so daß sich der hydrophobe Anteil
- 20 des Proteins an das Innere der Membran anlagern kann, wohingegen der hydrophile Anteil das Innere des Kanals ausmacht, wodurch eine geschützte hydrophile Umgebung bereitgestellt wird, durch die das ausgewählte hydrophile Molekül gelangen kann. Im Fachgebiet sind viele solche Poren/Kanäle bekannt, einschließlich
- 25 solche für Kalium-, Calcium-, Natrium- und Chloridionen.

- Dieses durch Poren und Kanäle vermittelte System ist auf sehr kleine Moleküle, wie Ionen, eingeschränkt, da Poren oder Kanäle, die hinreichend groß sind, daß sie den Durchtritt vollständiger
- 30 Proteine durch erleichterte Diffusion ermöglichen, auch nicht dazu fähig wären, den Durchtritt kleinerer Moleküle zu verhindern. Der Transport von Molekülen durch diesen Prozeß wird gelegentlich als "erleichterte Diffusion" bezeichnet, da die treibende Kraft eines Konzentrationsgradienten erforderlich ist,
- 35 damit der Transport stattfindet. Permeasen ermöglichen ebenfalls die erleichterte Diffusion größerer Moleküle, wie Glucose oder anderer Zucker, in die Zelle, wenn die Konzentration dieser Moleküle auf einer Seite der Membran größer ist als auf der anderen (ebenfalls als "Uniport" bezeichnet). Im Gegensatz zu Poren oder
- 40 Kanälen bilden diese integralen Proteine (die oft 6 bis 14 membranüberspannende α -Helices aufweisen) keine offenen Kanäle durch die Membran, sie binden jedoch an das Zielmolekül an der Membranoberfläche und durchlaufen dann eine Konformationsänderung, so daß das Zielmolekül an der entgegengesetzten Seite der Membran
- 45 freigesetzt wird.

17

Zellen benötigen jedoch oft den Import oder Export von Molekülen gegen den bestehenden Konzentrationsgradienten ("aktiver Transport"), eine Situation, in der die erleichterte Diffusion nicht stattfinden kann. Es gibt zwei generelle Mechanismen, die von der Zelle für einen solchen Membrantransport verwendet wird; Symport oder Antiport, und energiegekuppelter Transport, wie derjenige, der durch ABC-Transporter vermittelt wird. Symport- und Antiportsysteme koppeln die Bewegung von zwei unterschiedlichen Molekülen über die Membran (über Permeasen mit zwei gesonderten Bindungsstellen für zwei unterschiedliche Moleküle); beim Symport werden beide Moleküle in die gleiche Richtung transportiert, wohingegen beim Antiport ein Molekül importiert und das andere Molekül exportiert wird. Dies ist energetisch möglich, da sich eines dieser beiden Moleküle entlang eines Konzentrationsgradienten bewegt, und dieses energetisch günstige Ereignis wird nur durch die gleichzeitige Bewegung einer gewünschten Verbindung gegen den herrschenden Konzentrationsgradienten ermöglicht. Einzelne Moleküle können gegen den Konzentrationsgradienten über die Membran in einem energiegetriebenen Prozeß transportiert werden, wie bspw. bei den ABC-Transportern. Bei diesem System hat das in der Membran lokalisierte Transportprotein eine ATP-bindende Cassette, beim Binden des Zielmoleküls wird ATP in ADP + Pi umgewandelt, und die resultierende freigesetzte Energie wird zum Antreiben der Bewegung des Zielmoleküls zur entgegengesetzten Seite der Membran verwendet, was durch den Transporter erleichtert wird. Für eingehendere Beschreibungen all dieser Transportsysteme, siehe Bamberg, E. et al., (1993) "Charge transport of ion pumps on lipid bilayer membranes", Q. Rev. Biophys. 26: 1-25; Findlay, J.B.C. (1991) "Structure and function in membrane transport systems", Curr. Opin. Struct. Biol. 1: 804-810; Higgins, C.F. (1992) "ABC transporters from microorganisms to man", Ann. Rev. Cell. Biol. 8: 67-113; Gennis, R.B. (1989) "Pores, Channels and Transporters", in Biomebranes, Molecular Structure and Function, Springer: Heidelberg, S. 270-322; und Nikaido, H. und Saier, H. (1992) "Transport proteins in bacteria: common themes in their design", Science 258: 936-942, und die in jeder dieser Zitate enthaltenen Literaturstellen.

Die Synthese von Membranen ist ein gut charakterisierter Prozeß, an dem viele Komponenten beteiligt sind, von denen die wichtigsten die Lipidmoleküle sind. Die Lipidsynthese läßt sich in zwei Teile aufteilen: die Synthese von Fettsäuren und ihre Bindung an sn-Glycerin-3-Phosphat und die Addition oder Modifikation einer polaren Kopfgruppe. Übliche Lipide, die in Bakterienmembranen verwendet werden, umfassen Phospholipide, Glycolipide, Sphingolipide und Phosphoglyceride. Die Fettsäuresynthese ebginnt mit der Umwandlung von Acetyl-CoA in Malonyl-CoA durch Acetyl-CoA-carbo-

18

- xylase oder in Acetyl-ACP durch Acetyltransacylase. Nach einer Kondensationsreaktion bilden diese beiden Produktmoleküle zusammen Acetoacetyl-ACP, das durch eine Reihe von Kondensations-, Reduktions- und Dehydratisierungsreaktionen umgewandelt wird, so daß ein gesättigtes Fettsäuremolekül mit der gewünschten Kettenlänge erhalten wird. Die Produktion der ungesättigten Fettsäuren aus diesen Molekülen wird durch spezifische Desaturasen katalysiert, und zwar entweder aerob mittels molekularem Sauerstoff oder anaerob (für Beschreibungen der Fettsäuresynthese siehe F.C. 10 Neidhardt et al. (1996) *E. coli* und *Salmonella*. ASM Press: Washington, D.C. S. 612-636 und die darin angegebenen Literaturstellen; Lengeler et al. (Hrsg.) (1999) *Biology of Prokaryotes*. Thieme: Stuttgart, New York und die darin angegebenen Literaturstellen, und Magnuson, K. et al. (1993) *Microbiological Reviews* 57: 522-542 und die darin angegebenen Literaturstellen). Die Cyclopropan-Fettsäuren (CFA) werden durch eine spezifische CFA-Synthase mit SAM als Cosubstrat synthetisiert. Verzweigte Fettsäureketten werden aus verzweigten desaminierten Aminosäureketten synthetisiert, so daß verzweigte 2-Oxosäuren erhalten werden (s. 20 Lengeler et al. (Hrsg) (1999) *Biology of Prokaryotes*. Thieme: Stuttgart, New York und die darin angegebenen Literaturstellen). Ein weiterer wesentlicher Schritt bei der Lipidsynthese ist der Transfer von Fettsäuren auf die polaren Kopfgruppen bspw. durch Glycerinphosphatacyltransferasen. Die Kombination verschiedener 25 Vorstufenmoleküle und Biosyntheseenzyme bewirkt die Produktion verschiedener Fettsäuremoleküle, was eine erhebliche Auswirkung auf die Membranzusammensetzung hat.

III. Erfindungsgemäße Elemente und Verfahren

30

- Die vorliegende Erfindung beruht zumindest teilweise auf der Entdeckung von neuen Molekülen, die hier als MCT-Nukleinsäure- und -Protein-Moleküle bezeichnet werden und die Produktion von Zellmembranen in *C. glutamicum* steuern sowie die Bewegung von Molekülen über diese Membranen bewerkstelligen. Bei einer Ausführungsform sind die MCT-Moleküle am Metabolismus von Verbindungen beteiligt, die für den Aufbau der Zellmembranen in *C. glutamicum* oder am Transport der Moleküle über diese Membranen beteiligt sind. Bei einer bevorzugten Ausführungsform hat die Aktivität der 40 erfindungsgemäßen MCT-Moleküle zur Regulation der Produktion von Membrankomponenten eine Auswirkung auf die Produktion einer gewünschten Feinchemikalie durch diesen Organismus. Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist die Aktivität der modulierten MCT-Moleküle derart moduliert, daß die *C. glutamicum*- 45 Stoffwechselwege, die von den erfindungsgemäßen MCT-Proteinen reguliert werden, hinsichtlich Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion moduliert sind sowie hinsichtlich der

19

Effizienz des Transports der Verbindungen durch die Membranen verändert sind, was die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion einer gewünschten feinchemikalie durch *C. glutamicum* entweder direkt oder indirekt moduliert.

- 5 Der Begriff "MCT-Protein" oder "MCT-Polypeptid" umfaßt Proteine, die am Stoffwechsel von Verbindungen, die für den Aufbau von Zellmembranen in *C. glutamicum* notwendig sind, oder am Transport von Molekülen über diese Membranen beteiligt sind. Beispiele für
- 10 MCT-Proteine umfassen solche, die von den in Tabelle 1 und Anhang A aufgeführten MCT-Genen codiert werden. Die Ausdrücke "MCT-Gen" oder "MCT-Nukleinsäuresequenz" umfassen Nukleinsäuresequenzen, die ein MCT-Protein codieren, das aus einem codierenden Bereich und entsprechenden untranslatierten 5'- und 3'-Sequenzbereichen
- 15 besteht. Beispiele für MCT-Gene sind in Tabelle 1 aufgelistet. Die Begriffe "Produktion" oder "Produktivität" sind im Fachgebiet bekannt und beinhalten die Konzentration des Fermentationsproduktes (bspw. der gewünschten Feinchemikalie, die innerhalb einer festgelegten Zeitspanne und eines festgelegten Fermentationsvolu-
- 20 mens gebildet werden (bspw. kg Produkt pro Std. pro l). Der Begriff "Effizienz der Produktion" umfaßt die Zeit, die zur Erzielung einer bestimmten Produktionsmenge nötig ist (bspw. wie lange die Zelle zur Aufrichtung einer bestimmten Durchsatzrate einer Feinchemikalie benötigt). Der Begriff "Ausbeute" oder "Produkt/
- 25 Kohlenstoff-Ausbeute" ist im Fachgebiet bekannt und umfaßt die Effizienz der Umwandlung der Kohlenstoffquelle in das Produkt (d.h. die Feinchemikalie). Dies wird bspw. gewöhnlich ausgedrückt als kg Produkt pro kg Kohlenstoffquelle. Durch Vergrößern der Ausbeute oder Produktion der Verbindung wird die Menge der gewon-
- 30 nenen Moleküle oder der geeigneten gewonnenen Moleküle dieser Verbindung in einer bestimmten Kulturmenge über einen festgelegten Zeitraum erhöht. Die Begriffe "Biosynthese" oder "Biosyntheseweg" sind im Fachgebiet bekannt und umfassen die Synthese einer Verbindung, vorzugsweise einer organischen Verbindung, durch eine
- 35 Zelle aus Zwischenverbindungen, bspw. in einem Mehrschritt- oder stark regulierten Prozeß. Die Begriffe "Abbau" oder "Abbauweg" sind im Fachgebiet bekannt und umfassen die Spaltung einer Verbindung, vorzugsweise einer organischen Verbindung, durch eine Zelle in Abbauprodukte (allgemeiner gesagt, kleinere oder weniger
- 40 komplexe Moleküle), bspw. in einem Mehrschritt- oder stark regulierten Prozeß. Der Begriff "Metabolismus" ist im Fachgebiet bekannt und umfaßt die Gesamtheit der biochemischen Reaktionen, die in einem Organismus stattfinden. Der Metabolismus einer bestimmten Verbindung (z.B. der Metabolismus einer Aminosäure, wie
- 45 Glycin) umfaßt dann sämtliche Biosynthese-, Modifikations- und Abbauege dieser Verbindung in der Zelle.

20

Die erfindungsgemäßen MCT-Moleküle sind in einer anderen Ausführungsform befähigt, die Produktion eines gewünschten Moleküls, wie einer Feinchemikalie, in einem Mikroorganismus, wie *C. glutamicum*, zu modulieren. Es gibt eine Reihe von Mechanismen, durch

5 die die Veränderung eines erfindungsgemäßen MCT-Proteins die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion einer Feinchemikalie aus einem *C. glutamicum*-Stamm, der ein solches verändertes Protein enthält, direkt beeinflussen kann. Diese MCT-Proteine, die am Export der Feinchemikalienmoleküle aus der Zelle

10 beteiligt sind, können in größerer Anzahl vorliegen oder erhöhte Aktivität aufweisen, so daß größere Mengen dieser Verbindungen in das extrazelluläre Medium sezerniert werden, aus dem sie leichter gewonnen werden können. MCT-Proteine, die am Import der Nährstoffe beteiligt sind, die für die Biosynthese von einer oder

15 mehreren Feinchemikalien notwendig sind (bspw. Phosphat, Sulfat, Stickstoffverbindungen, usw.) können entsprechend in größerer Anzahl oder mit höherer Aktivität zugegen sein, so daß diese Vorstufen-, Cofaktor- oder Zwischenverbindungen in höherer Konzentration in der Zelle vorliegen. Zudem sind Fettsäuren und Lipide

20 selbst wünschenswerte Feinchemikalien; durch Optimieren der Aktivität oder Vergrößern der Anzahl von einem oder mehreren erfindungsgemäßen MCT-Proteinen, die an der Biosynthese dieser Verbindungen beteiligt sind, oder durch Beeinflussen der Aktivität von einem oder mehreren MCT-Proteinen, die am Abbau dieser Verbindungen

25 beteiligt sind, kann man die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion von Fettsäure- und Lipidmolekülen aus *C. glutamicum* steigern.

Die Mutagenese von einem oder mehreren erfindungsgemäßen Genen

30 kann auch MCT-Proteine mit veränderten Aktivitäten hervorbringen, die die Produktion von einer oder mehreren Feinchemikalien aus *C. glutamicum* beeinflussen. Erfindungsgemäße MCT-Proteine, die am Export von Abfallprodukten beteiligt sind, können in größerer Anzahl oder höherer Aktivität zugegen sein, so daß die normalen

35 Stoffwechselabfälle der Zelle (aufgrund von Überproduktion der gewünschten Feinchemikalie möglicherweise in höherer Quantität) effizient exportiert werden, bevor sie Nukleotide und Proteine innerhalb der Zelle beschädigen (was die Lebensfähigkeit der Zelle herabsetzt) oder mit anderen Feinchemikalien-Stoffwechsel-

40 wegen interagieren (was die Ausbeute, Produktion oder Effizienz der Produktion der gewünschten Feinchemikalie herabsetzt). Die relativ großen intrazellulären Mengen der gewünschten Feinchemikalie können an sich für die Zelle toxisch sein. Durch Vergrößern der Anzahl von Transportern, die zum Export dieser Verbindung aus

45 der Zelle befähigt ist, kann man somit die Lebensfähigkeit der Zelle in Kultur steigern, was wiederum eine größere Zahl an Zellen in Kultur mit sich bringt, die die gewünschte Feinchemikalie

21

produzieren. Die erfindungsgemäßen MCT-Proteine lassen sich derart manipulieren, daß die relativen Mengen unterschiedlicher Lipid- und Fettsäuremoleküle produziert werden. Dies kann eine erhebliche Auswirkung auf die Lipidzusammensetzung der Zellmembran haben. Da jeder Lipidtyp andere physikalische Eigenschaften aufweist, kann eine Veränderung der Lipidzusammensetzung einer Membran die Membranfluidität signifikant verändern. Änderungen der Membranfluidität können den Transport von Molekülen über die Membran sowie die Zellintegrität beeinflussen, was jeweils eine erhebliche Auswirkung auf die Produktion von Feinchemikalien von *C. glutamicum* in großangelegten Fermenterkulturen hat.

Die isolierten erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen befinden sich im Genom eines *Corynebacterium glutamicum*-Stammes, der von der American Type Culture Collection unter der Bezeichnung ATCC 13032 erhältlich ist. Die Nukleotidsequenz der isolierten *C. glutamicum*-MCT-cDNAs und die vorhergesagten Aminosäuresequenzen der *C. glutamicum*-MCT-Proteine sind im Anhang A bzw. B gezeigt. Es wurden Computeranalysen durchgeführt, die diese Nukleotidsequenzen als Sequenzen klassifizierten und/oder identifizierten, die Proteine codieren, die am Metabolismus von Zellmembrankomponenten beteiligt sind, oder Proteine, die am Transport von Verbindungen über die Membran beteiligt sind.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch Proteine, deren Aminosäuresequenz zu einer Aminosäuresequenz in Anhang B im wesentlichen homolog ist. Wie hier verwendet, ist ein Protein, dessen Aminosäuresequenz zu einer ausgewählten Aminosäuresequenz im wesentlichen homolog ist, zur ausgewählten Aminosäuresequenz zumindest zu etwa 50% homolog, bspw. zur gesamten ausgewählten Aminosäuresequenz. Ein Protein, dessen Aminosäuresequenz zu einer ausgewählten Aminosäuresequenz im wesentlichen homolog ist, kann auch mindestens zu etwa 50-60%, vorzugsweise mindestens zu etwa 60-70%, stärker bevorzugt mindestens etwa 70-80%, 80-90% oder 90-95% und am stärksten bevorzugt mindestens zu etwa 96%, 97%, 98%, 99% oder noch homologer zur ausgewählten Aminosäuresequenz sein.

Das erfindungsgemäße MCT-Protein oder ein biologisch aktiver Abschnitt oder Fragmente davon können am Metabolismus von Verbindungen, die für den Aufbau der Zellmembranen in *C. glutamicum* notwendig sind, oder am Transport von Molekülen über diese Membranen beteiligt sein, oder können eine oder mehrere der in Tabelle 1 aufgeführten Aktivitäten aufweisen.

22

In den nachstehenden Unterabschnitten sind verschiedene Aspekte der Erfindung ausführlicher beschrieben:

A. Isolierte Nukleinsäuremoleküle

5

Ein Aspekt der Erfindung betrifft isolierte Nukleinsäuremoleküle, die MCT-Polypeptide oder biologisch aktive Abschnitte davon codieren, sowie Nukleinsäurefragmente, die zur Verwendung als Hybridisierungssonden oder Primer zur Identifizierung oder

- 10 Amplifizierung von MCT-codierenden Nukleinsäuren (z.B. MCT-DNA) hinreichen. Der Begriff "Nukleinsäuremolekül" soll DNA-Moleküle (z.B. cDNA oder genomische DNA) und RNA-Moleküle (z.B. mRNA) sowie DNA- oder RNA-Analoga, die mittels Nukleotidanaloga erzeugt werden, umfassen. Dieser Begriff umfaßt zudem die am 3'- und
- 15 am 5'-Ende des codierenden Genbereichs gelegene untranslatierte Sequenz: mindestens etwa 100 Nukleotide der Sequenz stromaufwärts des 5'-Endes des codierenden Bereichs und mindestens etwa 20 Nukleotide der Sequenz stromabwärts des 3'-Endes des codierenden Genbereichs. Das Nukleinsäuremolekül kann einzelsträngig oder
- 20 doppelsträngig sein, ist aber vorzugsweise eine doppelsträngige DNA. Ein "isoliertes" Nukleinsäuremolekül wird aus anderen Nukleinsäuremolekülen abgetrennt, die in der natürlichen Quelle der Nukleinsäure zugegen sind. Eine "isolierte" Nukleinsäure hat vorzugsweise keine Sequenzen, die die Nukleinsäure in der genomischen DNA des Organismus, aus dem die Nukleinsäure stammt, natürlicherweise flankieren (bspw. Sequenzen, die sich am 5'- bzw.
- 25 3'-Ende der Nukleinsäure befinden). In verschiedenen Ausführungsformen kann bspw. das isolierte MCT-Nukleinsäuremolekül weniger als etwa 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb oder 0,1 kb der
- 30 Nukleotidsequenzen, die natürlicherweise das Nukleinsäuremolekül in der genomischen DNA der Zelle, aus der die Nukleinsäure stammt (bspw. eine *C. glutamicum*-Zelle) flankieren. Ein "isoliertes" Nukleinsäuremolekül, wie ein cDNA-Molekül, kann überdies im wesentlichen frei von einem anderen zellulären Material oder
- 35 Kulturmedium sein, wenn es durch rekombinante Techniken hergestellt wird, oder frei von chemischen Vorstufen oder anderen Chemikalien sein, wenn es chemisch synthetisiert wird.

Ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül, bspw. eine Nuklein-

- 40 säuremolekül mit einer Nukleotidsequenz aus Anhang A oder ein Abschnitt davon, kann mittels molekularbiologischer Standard-Techniken und der hier bereitgestellten Sequenzinformation isoliert werden. Bspw. kann eine *C. glutamicum*-MCT-cDNA aus einer *C. glutamicum*-Bank isoliert werden, indem eine vollständige Sequenz aus
- 45 Anhang A oder ein Abschnitt davon als Hybridisierungssonde und Standard-Hybridisierungstechniken (wie bspw. beschrieben in Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. Molecular Cloning: A

23

- Laboratory Manual. 2. Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) verwendet werden. Überdies läßt sich ein Nukleinsäuremolekül, umfassend eine vollständige Sequenz aus Anhang A oder ein Abschnitt davon, durch Polymerasekettenreaktion isolieren, wobei die Oligonukleotidprimer, die auf der Basis dieser Sequenz erstellt wurden, verwendet werden (z.B. kann ein Nukleinsäuremolekül, umfassend eine vollständige Sequenz aus Anhang A oder einen Abschnitt davon, durch Polymerasekettenreaktion isoliert werden, indem
- 10 Oligonukleotidprimer verwendet werden, die auf der Basis dieser gleichen Sequenz aus Anhang A erstellt worden sind). Bspw. läßt sich mRNA aus normalen Endothelzellen isolieren (bspw. durch das Guanidiniumthiocyanat-Extraktionsverfahren von Chirgwin et al. (1979) Biochemistry 18: 5294-5299) und die cDNA kann mittels
- 15 reverser Transkriptase (bspw. Moloney-MLV-Reverse-Transkriptase, erhältlich bei Gibco/BRL, Bethesda, MD, oder AMV-Reverse-Transkriptase, erhältlich von Seikagaku America, Inc., St. Petersburg, FL) hergestellt werden. Synthetische Oligonukleotidprimer für die Amplifizierung via Polymeraseketterreaktion lassen sich auf der
- 20 Basis einer der in Anhang A gezeigten Nukleotidsequenzen erstellen. Eine erfindungsgemäße Nukleinsäure kann mittels cDNA oder alternativ genomischer DNA als Matrize und geeigneten Oligonukleotidprimern gemäß PCR-Standard-Amplifikationstechniken amplifiziert werden. Die so amplifizierte Nukleinsäure kann in einen
- 25 geeigneten Vektor kloniert werden und durch DNA-Sequenzanalyse charakterisiert werden. Oligonukleotide, die einer MCT-Nukleotidsequenz entsprechen, können durch Standard-Syntheseverfahren, bspw. mit einem automatischen DNA-Synthesegerät, hergestellt werden.
- 30
- Bei einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt ein erfindungsgemäßes isoliertes Nukleinsäuremolekül eine der in Anhang A aufgeführten Nukleotidsequenzen. Die Sequenzen von Anhang A entsprechen den erfindungsgemäßen MCT-cDNAs aus *Corynebacterium glutamicum*. Diese cDNAs umfassen Sequenzen, die MCT-Proteine (d.h. den
- 35 "codierenden Bereich", der in jeder Sequenz in Anhang A angegeben ist), sowie die 5'-. und 3'-untranslatierten Sequenzen, die ebenfalls in Anhang A angegeben sind. Das Nukleinsäuremolekül kann alternativ nur den codierenden Bereich einer der Sequenzen in
- 40 Anhang A umfassen.

- Für erfindungsgemäße Zwecke hat selbstverständlich jede der in Anhang A angegebenen Sequenzen eine RXA- oder RXN-Identifizierungsnummer, wobei hinter der Bezeichnung "RXA" oder "RXN" 5
- 45 Ziffern aufgeführt sind (bspw. RXA00001). Jede dieser Sequenzen umfaßt bis zu drei Abschnitte: einen stromaufwärts gelegenen 5'-Bereich, einen codierenden Bereich, und einen stromabwärts

24

gelegenen 3'-Bereich. Jeder dieser drei Bereiche ist durch die gleiche RXA- oder RXN-Bezeichnung gekennzeichnet, um Verwirrung zu vermeiden. Die Bezeichnung "eine der Sequenzen in Anhang A" steht für eine der Sequenzen in Anhang A, die sich durch ihre unterschiedlichen RXA- oder RXN-Nummern unterscheiden lassen. Der codierende Bereich jeder Sequenz wird in die entsprechende Aminosäuresequenz translatiert, die in Anhang B angegeben ist. Die Sequenzen in Anhang B werden durch die gleichen RXA- oder RXN-Nummern wie in Anhang A identifiziert, so daß sie sich leicht zuordnen lassen. Bspw. ist die mit RXA00001 bezeichnete Aminosäuresequenz in Anhang B eine Translation des codierenden Bereichs der Nukleotidsequenz des Nukleinsäuremoleküls RXA00001 in Anhang A.

Bei einer Ausführungsform sollen die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle nicht die in Tabelle 2 zusammengestellten umfassen. Eine Sequenz für das *dapD*-Gen wurde in Wehrmann, A. et al. (1998) J. Bacteriol. 180(12): 3159-3165 veröffentlicht. Die von den Erfindern der vorliegenden Patentanmeldung gewonnene Sequenz ist jedoch erheblich länger als die veröffentlichte Version. Man nimmt an, daß die veröffentlichte Version auf einem inkorrekten Startcodon beruht, und somit nur ein Fragment des eigentlichen codierenden Bereichs ausmacht.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfaßt ein erfindungsgemäßes isoliertes Nukleinsäuremolekül ein zu einer der in Anhang A gezeigten Nukleotidsequenzen komplementäres Nukleinsäuremolekül oder einen Abschnitt davon, wobei es sich um ein Nukleinsäuremolekül handelt, das zu einer der in Anhang A gezeigten Nukleotidsequenzen hinreichend komplementär ist, daß es mit einer der in Anhang A angegebenen Sequenzen hybridisieren kann, wodurch ein stabiler Duplex entsteht.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfaßt ein erfindungsgemäßes isoliertes Nukleinsäuremolekül eine Nukleotidsequenz, die mindestens etwa 50-60%, vorzugsweise mindestens etwa 60-70%, stärker bevorzugt mindestens etwa 70-80%, 80-90% oder 90-95% und noch stärker bevorzugt mindestens etwa 95%, 96%, 97%, 98%, 99% oder noch homologer zu einer in Anhang A angegebenen Nukleotidsequenz oder einem Abschnitt davon ist. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfaßt ein erfindungsgemäßes isoliertes Nukleinsäuremolekül eine Nukleotidsequenz, die, bspw. unter stringenten Bedingungen, mit einer der in Anhang A gezeigten Nukleotidsequenzen oder einem Abschnitt davon hybridisiert.

Das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül kann überdies nur einen Abschnitt des codierenden Bereichs von einer der Sequenzen in Anhang A umfassen, bspw. ein Fragment, das als Sonde oder Primer

25

- oder Fragment verwendet werden kann, welches einen biologisch aktiven Abschnitt eines MCT-Proteins codiert. Die aus der Klonierung der MCT-Gene aus *C. glutamicum* ermittelten Nukleotidsequenzen ermöglichen die Erzeugung von Sonden und Primern, die zur
- 5 Identifizierung und/oder Klonierung von MCT-Homologa in anderen Zelltypen und Organismen und MCT-Homologa von anderen Corynebakterien oder verwandten Arten ausgelegt sind.. Die Sonde bzw. der Primer umfassen gewöhnlich im wesentlichen gereinigtes Oligonukleotid. Das Oligonukleotid umfaßt gewöhnlich einen Nukleotid-
- 10 sequenzbereich, der unter stringenten Bedingungen an mindestens etwa 12, vorzugsweise etwa 25, stärker bevorzugt etwa 40, 50 oder 75 aufeinanderfolgende Nukleotide eines Sense-Stranges von einer der in Anhang A angegebenen Sequenzen, eines Antisense-Stranges von einer der in Anhang A angegebenen Sequenzen oder natürlich
- 15 vorkommenden Mutanten davon hybridisiert. Primer auf der Basis einer Nukleotidsequenz aus Anhang A können in PCR-Reaktionen zur Klonierung von MCT-Homologa verwendet werden. Sonden auf der Basis der MCT-Nukleotidsequenzen können zum Nachweisen von Transkripten oder genomischen Sequenzen, die das gleiche oder homologe
- 20 Proteine codieren, verwendet werden. In bevorzugten Ausführungsformen umfaßt die Sonde zudem eine daran gebundene Markierungsgruppe, bspw. ein Radioisotop, eine fluoreszierende Verbindung, ein Enzym oder einen Enzym-Cofaktor. Diese Sonden können als Teil eines diagnostischen Test-Kits zur Identifizierung von Zellen
- 25 verwendet werden, die ein MCT-Protein misexprimieren, wie durch Messen einer Menge einer MCT-codierenden Nukleinsäure in einer Zellenprobe, bspw. Messen der MCT-mRNA-Spiegel oder durch Bestimmen, ob ein genomisches MCT-Gen mutiert oder deletiert ist.
- 30 Bei einer Ausführungsform codiert das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül ein Protein oder einen Abschnitt davon, der eine Aminosäuresequenz umfaßt, die hinreichend homolog zu einer Aminosäuresequenz von Anhang B ist, daß das Protein oder ein Abschnitt davon weiterhin am Metabolismus von Verbindungen, die für den
- 35 Aufbau der Zellmembranen in *C. glutamicum* notwendig sind, oder am Transport der Moleküle über diese Membranen beteiligt sein kann. Wie hier verwendet, betrifft der Begriff "hinreichend homolog" Proteine oder Abschnitte davon, deren Aminosäuresequenzen eine minimale Anzahl identischer oder äquivalenter Aminosäurereste
- 40 (bspw. ein Aminosäurerest mit einer ähnlichen Seitenkette wie ein Aminosäurerest in einer der Sequenzen von Anhang B) zu einer Aminosäuresequenz aus Anhang B aufweisen, so daß das Protein oder ein Abschnitt davon weiterhin am Metabolismus von Verbindungen, die für den Aufbau der Zellmembranen in *C. glutamicum* notwendig
- 45 sind, oder am Transport der Moleküle über diese Membranen beteiligt sein kann. Proteinbestandteile dieser Stoffwechselwege für Membrankomponenten oder Membrantransportsysteme, wie hier be-

26

- schrieben, können eine Rolle bei der Produktion und Sekretion von einer oder mehreren Feinchemikalien spielen. Beispiele dieser Aktivitäten sind ebenfalls hier beschrieben. Somit betrifft die
- 5 Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion von einer oder mehreren Feinchemikalien. In Tabelle 1 sind Beispiele der MCT-Proteinaktivitäten angegeben.

- Bei einer weiteren Ausführungsform ist das Protein mindestens
- 10 etwa 50-60%, vorzugsweise mindestens etwa 60-70%, stärker bevorzugt mindestens etwa 70-80%, 80-90%, 90-95% und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 96%, 97%, 98%, 99% oder noch homologer zu einer vollständigen Aminosäuresequenz in Anhang B.

- 15 Abschnitte von Proteinen, die von den erfindungsgemäßen MCT-Nukleinsäuremolekülen codiert werden, sind vorzugsweise biologisch aktive Abschnitte von einem der MCT-Proteine. Der Begriff "biologisch aktiver Abschnitt eines MCT-Proteins", wie er hier verwendet wird, soll einen Abschnitt, bspw. eine Domäne oder ein
- 20 Motiv, eines MCT-Proteins umfassen, die/das am Metabolismus von Verbindungen, die für den Aufbau der Zellmembranen in *C. glutamicum* notwendig sind, oder am Transport von Molekülen über diese Membranen beteiligt sein kann, oder eine in Tabelle 1 angegebene Aktivität aufweist. Zur Bestimmung, ob ein MCT-Protein oder ein
- 25 biologisch aktiver Abschnitt davon am Metabolismus von Verbindungen, die für den Aufbau der Zellmembranen in *C. glutamicum* notwendig sind, oder am Transport von Molekülen über diese Membranen beteiligt sein kann, kann ein Test der enzymatischen Aktivität durchgeführt werden. Diese Testverfahren, wie eingehend beschrieben in Beispiel 8 des Beispielteils, sind dem Fachmann geläufig.
- 30

- Zusätzliche Nukleinsäurefragmente, die biologisch aktive Abschnitte eines MCT-Proteins codieren, lassen sich durch Isolieren eines Abschnitts von einer der Sequenzen in Anhang B, Exprimieren
- 35 des codierten Abschnitts des MCT-Proteins oder -Peptides (z.B. durch rekombinante Expression in vitro) und Bestimmen der Aktivität des codierten Abschnittes des MCT-Proteins oder Peptides herstellen.

- 40 Die Erfindung umfaßt zudem Nukleinsäuremoleküle, die sich von einer der in Anhang A gezeigten Nukleotidsequenzen (und Abschnitten davon) aufgrund des degenerierten genetischen Codes unterscheiden und somit das gleiche MCT-Protein codieren wie dasjenige, das von den in Anhang A gezeigten Nukleotidsequenzen codiert wird. In ei-
- 45 ner anderen Ausführungsform hat ein erfindungsgemäßes isoliertes Nukleinsäuremolekül eine Nukleotidsequenz, die ein Protein mit einer in Anhang B gezeigten Aminosäuresequenz codiert. In einer

27

weiteren Ausführungsform codiert das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül ein *C. glutamicum*-Vollängenprotein, das zu einer Aminosäuresequenz aus Anhang B (codiert von einem in Anhang A gezeigten offenen Leseraster) im wesentlichen homolog ist.

5

- Zusätzlich zu den in Anhang A gezeigten *C. glutamicum*-MCT-Nukleotidsequenzen, geht der Fachmann davon aus, daß DNA-Sequenzpolymorphismen, die zu Änderungen in den Aminosäuresequenzen von MCT-Proteinen führen, innerhalb einer Population (bspw. der *C. glutamicum*-Population) existieren können. Diese genetischen Polymorphismen im MCT-Gen können zwischen Individuen innerhalb einer Population aufgrund der natürlichen Variation existieren. Wie hier verwendet, bedeuten die Begriffe "Gen" und "rekombinantes Gen" Nukleinsäuremoleküle mit einem offenen Leseraster, das ein MCT-Protein, vorzugsweise *C. glutamicum*-MCT-Protein codiert. Diese natürlichen Variationen bewirken üblicherweise eine Varianz von 1-5% in der Nukleotidsequenz des MCT-Gens. Sämtliche Nukleotidvariationen und daraus resultierenden Aminosäurepolymorphismen in MCT, die das Ergebnis natürlicher Variation sind und die funktionelle Aktivität von MCT-Proteinen nicht verändern, sollen im Umfang der Erfindung liegen.

- Nukleinsäuremoleküle, die den natürlichen Varianten entsprechen, und Nicht-*C. glutamicum*-Homologa der erfindungsgemäßen *C. glutamicum*-MCT-cDNA können auf der Grundlage ihrer Homologie zur hier offenbarten *C. glutamicum*-MCT-Nukleinsäure mit der *C. glutamicum*-cDNA oder einem Abschnitt davon als Hybridisierungssonde gemäß Standard-Hybridisierungstechniken unter stringenten Hybridisierungsbedingungen isoliert werden. In einer anderen Ausführungsform ist ein erfindungsgemäßes isoliertes Nukleinsäuremolekül mindestens 15 Nukleotide lang und hybridisiert unter stringenten Bedingungen mit dem Nukleinsäuremolekül, das eine Nukleotidsequenz aus Anhang A umfaßt. In anderen Ausführungsformen ist die Nukleinsäure mindestens 30, 50, 100, 250 Nukleotide lang oder länger. Der Begriff "hybridisiert unter stringenten Bedingungen", wie er hier verwendet wird, soll Hybridisierungs- und Waschbedingungen beschreiben, unter denen Nukleotidsequenzen, die mindestens 60% homolog zueinander sind, gewöhnlich aneinander hybridisiert bleiben. Die Bedingungen sind vorzugsweise derart, daß Sequenzen, die mindestens etwa 65%, stärker bevorzugt mindestens etwa 70% und noch stärker bevorzugt mindestens etwa 75% oder stärker zueinander homolog sind, gewöhnlich aneinander hybridisiert bleiben. Diese stringenten Bedingungen sind dem Fachmann bekannt und lassen sich in Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY. (1989), 6.3.1-6.3.6. finden. Ein bevorzugtes, nicht-einschränkendes Beispiel für stringente Hybridisierungsbedingungen ist eine Hybridisierung in

28

6x Natriumchlorid/Natriumcitrat (SSC) bei etwa 45°C, gefolgt von einem oder mehreren Waschschritten in 0,2x SSC, 0,1% SDS bei 50-65°C. Ein erfindungsgemäßes isoliertes Nukleinsäuremolekül, das unter stringenten Bedingungen an eine Sequenz aus Anhang A hybridisiert, entspricht vorzugsweise einem natürlich vorkommenden Nukleinsäuremolekül. Wie hier verwendet betrifft ein "natürlich vorkommendes" Nukleinsäuremolekül ein RNA- oder DNA-Molekül, mit einer Nukleotidsequenz, die in der Natur vorkommt (bspw. ein natürliches Protein codiert). Bei einer Ausführungsform codiert die Nukleinsäure ein natürlich vorkommendes *C. glutamicum*-MCT-Protein.

Zusätzlich zu natürlich vorkommenden Varianten der MCT-Sequenz, die in der Population existieren können, ist der Fachmann sich ebenfalls dessen bewußt, daß Änderungen durch Mutation in eine Nukleotidsequenz von Anhang A eingebracht werden können, was zur Änderung der Aminosäuresequenz des codierten MCT-Proteins führt, ohne daß die Funktionsfähigkeit des MCT-Proteins beeinträchtigt wird. Bspw. lassen sich Nukleotidsusbtitutionen, die an "nicht-essentiellen" Aminosäureresten zu Aminosäuresubstitutionen führen, in einer Sequenz von Anhang A herstellen. Ein "nicht-essentieller" Aminosäurerest läßt sich in einer Wildtypsequenz von einem der MCT-Proteine (Anhang B) verändern, ohne daß die Aktivität des MCT-Proteins verändert wird, wohingegen ein "essentieller" Aminosäurerest für die MCT-Proteinaktivität erforderlich ist. Andere Aminosäurereste jedoch (bspw. nicht-konservierte oder lediglich semikonservierte Aminosäurereste in der Domäne mit MCT-Aktivität) können für die Aktivität nicht essentiell sein und lassen sich somit wahrscheinlich verändern, ohne daß die MCT-Aktivität verändert wird.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Nukleinsäuremoleküle, die MCT-Proteine codieren, die veränderte Aminosäurereste enthalten, die für die MCT-Aktivität nicht-essentiell sind. Diese MCT-Proteine unterscheiden sich in der Aminosäuresequenz von einer Sequenz in Anhang B und behalten zumindest eine der hier beschriebenen MCT-Aktivitäten. Das isolierte Nukleinsäuremolekül umfaßt bei einer Ausführungsform eine Nukleotidsequenz, die ein Protein codiert, das eine Aminosäuresequenz umfaßt, die mindestens etwa 50% Homologie zu einer Aminosäuresequenz aus Anhang B aufweist, und am Metabolismus von Verbindungen, die für den Aufbau der Zellmembranen in *C. glutamicum* notwendig sind, oder am Transport von Molekülen über diese Membranen beteiligt sein kann, oder eine oder mehrere der in Tabelle 1 aufgeführten Aktivitäten besitzt. Das von dem Nukleinsäuremolekül codierte Protein weist vorzugsweise mindestens etwa 50-60%, stärker bevorzugt mindestens etwa 60-70%, noch stärker bevorzugt mindestens etwa 70-80%,

29

80-90%, 90-95%, und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 96%, 97%, 98% oder 99% Homologie zu einer der Sequenzen in Anhang B auf.

- 5 Zur Bestimmung der prozentualen Homologie von zwei Aminosäuresequenzen (bspw. einer der Sequenzen aus Anhang B und einer mutierten Form davon) oder von zwei Nukleinsäuren, werden die Sequenzen für optimale Vergleichszwecke untereinander geschrieben (bspw. können Lücken in die Sequenz eines Proteins oder einer Nukleinsäure eingefügt werden, damit ein optimales Alignment mit dem anderen Protein oder der anderen Nukleinsäure erzeugt wird). Die Aminosäurereste oder die Nukleotide werden dann an den entsprechenden Aminosäure- oder Nukleotidstellen miteinander verglichen. Wenn eine Position in einer Sequenz (bspw. eine der Sequenzen von
- 10 Anhang B) vom gleichen Aminosäurerest oder Nukleotid belegt wird, wie an der entsprechenden Stelle in der anderen Sequenz (bspw. eine mutierte Form der aus Anhang B ausgewählten Sequenz), dann sind die Moleküle an dieser Stelle homolog (d.h. der hier verwendete Begriff Aminosäure- oder Nukleinsäure-"Homologie" ist äquivalent zu Aminosäure- oder Nukleinsäure-"Identität"). Die prozentuale Homologie zwischen den beiden Sequenzen ist eine Funktion der Anzahl der identischen Stellen in allen Sequenzen (d.h. % Homologie = Anzahl der identischen Stellen/Gesamtanzahl der Positionen x 100).

25

- Ein isoliertes Nukleinsäuremolekül, das ein MCT-Protein codiert, das zu einer Proteinsequenz aus Anhang B homolog ist, kann durch Einbringen von einer oder mehreren Nukleotidsubstitutionen, -additionen oder -deletionen in eine Nukleotidsequenz aus Anhang
- 30 A erzeugt werden, so daß eine oder mehrere Aminosäuresubstitutionen, -additionen oder -deletionen in das codierte Protein eingebracht werden. Die Mutationen können in eine der Sequenzen aus Anhang A durch Standard-Techniken eingebracht werden, wie stellengerichtete Mutagenese und PCR-vermittelte Mutagenese. Vorzugsweise werden konservative Aminosäuresubstitutionen an einer oder mehreren der vorhergesagten nicht-essentiellen Aminosäureresten eingeführt. Bei einer "konservativen Aminosäuresubstitution" wird der Aminosäurerest durch einen Aminosäurerest mit einer ähnlichen Seitenkette ausgetauscht. Im Fachgebiet sind Familien
- 40 von Aminosäureresten mit ähnlichen Seitenketten definiert worden. Diese Familien umfassen Aminosäuren mit basischen Seitenketten (z.B. Lysin, Arginin, Histidin), sauren Seitenketten (z.B. Asparaginsäure, Glutaminsäure), ungeladenen polaren Seitenketten (z.B. Glycin, Asparagin, Glutamin, Serin, Threonin, Tyrosin,
- 45 Cystein), nicht-polaren Seitenketten, (bspw. Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Prolin, Phenylalanin, Methionin, Tryptophan), beta-verzweigten Seitenketten (z.B. Threonin, Valin, Isoleucin)

30

- und aromatischen Seitenketten (z.B. Tyrosin, Phenylalanin, Tryptophan, Histidin). Ein vorhergesagter nicht-essentieller Aminosäurerest in einem MCT-Protein wird somit vorzugsweise durch einen anderen Aminosäurerest der gleichen Seitenkettenfamilie
- 5 ausgetauscht. In einer weiteren Ausführungsform können die Mutationen alternativ zufallsgemäß über die gesamte oder einen Teil der MCT-codierenden Sequenz eingebracht werden, bspw. durch Sättigungsmutagenese, und die resultierenden Mutanten können auf die hier beschriebene MCT-Aktivität untersucht werden, um Mutanten zu
- 10 identifizieren, die eine MCT-Aktivität beibehalten. Nach der Mutagenese von einer der Sequenzen aus Anhang A kann das codierte Protein rekombinant exprimiert werden, und die Aktivität des Proteins kann bspw. mit den hier beschriebenen Tests (siehe Beispiel 8 des Beispielteils) bestimmt werden.
- 15
- Zusätzlich zu den Nukleinsäuremolekülen, die die vorstehend beschriebenen MCT-Proteine codieren, betrifft ein weiterer Aspekt der Erfindung isolierte Nukleinsäuremoleküle, die antisense dazu sind. Eine "Antisense"-Nukleinsäure umfaßt eine Nukleotidsequenz,
- 20 die zu einer "Sense"-Nukleinsäure, welche ein Protein codiert, komplementär ist, bspw. komplementär zum codierenden Strang eines doppelsträngigen cDNA-Moleküls oder komplementär zu einer mRNA-Sequenz. Eine Antisense-Nukleinsäure kann folglich über Wasserstoffbrückenbindungen an eine Sense-Nukleinsäure binden. Die
- 25 Antisense-Nukleinsäure kann zum gesamten MCT-codierenden Strang oder nur zu einem Abschnitt davon komplementär sein. Bei einer Ausführungsform ist ein Antisense-Nukleinsäuremolekül antisense zu einem "codierenden Bereich" des codierenden Stranges einer Nukleotidsequenz, die ein MCT-Protein codiert. Der Begriff "co-
- 30 dierender Bereich" betrifft den Bereich der Nukleotidsequenz, der Codons umfaßt, die in Aminosäurereste translatiert werden (bspw. umfaßt der gesamte codierende Bereich von SEQ.-ID. RXA00001 die Nukleotide 1 bis 1128). Bei einer weiteren Ausführungsform ist das Antisense-Nukleinsäuremolekül antisense zu einem "nicht-
- 35 codierenden Bereich" des codierenden Stranges einer Nukleotidsequenz, die MCT codiert. Der Begriff "nicht-codierender Bereich" betrifft 5'- und 3'-Sequenzen, die den codierenden Bereich flankieren und nicht in Aminosäuren translatiert werden (d.h. die auch als 5'- und 3'-untranslatierte Bereiche bezeichnet werden).
- 40
- Bei den hier offenbarten Sequenzen des codierenden Stranges, die das MCT codieren (bspw. die Sequenzen aus Anhang A), können die erfindungsgemäßen Antisense-Nukleinsäuren gemäß der Regeln der Watson-Crick-Basenpaarung ausgestaltet werden. Das Antisense-
- 45 Nukleinsäuremolekül kann zum gesamten codierenden Bereich von MCT-mRNA komplementär sein, ist aber stärker bevorzugt ein Oligonukleotid, das zu lediglich einem Abschnitt des codierenden oder

31

- nicht-codierenden Bereichs der MCT-mRNA antisense ist. Das Antisense-Oligonukleotid kann bspw. zum Bereich, der die Translationsstartstelle von MCT-mRNA umgibt, komplementär sein. Ein Antisense-Oligonukleotid kann bspw. etwa 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 oder 50 Nukleotide lang sein. Eine erfindungsgemäße Antisense-Nukleinsäure kann mittels chemischer Synthese und enzymatischer Ligationsreaktionen mittels im Fachgebiet bekannter Verfahren konstruiert werden. Eine Antisense-Nukleinsäure (bspw. ein Antisense-Oligonukleotid) kann bspw. chemisch synthetisiert werden, wobei natürlich vorkommende Nukleotide oder verschieden modifizierte Nukleotide verwendet werden, die so aufgebaut sind, daß sie die biologische Stabilität der Moleküle erhöhen, oder die physikalische Stabilität des Duplexes erhöhen, der zwischen der Antisense- und Sense-Nukleinsäure entstanden ist. Bspw. können Phosphorthioat-Derivate und acridinsubstituierte Nukleotide verwendet werden. Beispiele modifizierter Nukleotide, die zur Erzeugung der Antisense-Nukleinsäure verwendet werden können, sind u.a. 5-Fluoruracil, 5-Bromuracil, 5-Chloruracil, 5-Ioduracil, Hypoxanthin, Xanthin, 4-Acetylcytosin, 5-(Carboxyhydroxymethyl)uracil, 5-Carboxymethylaminomethyl-2-thiouridin, 5-Carboxymethylaminomethyluracil, Dihydrouracil, Beta-D-Galactosylqueosin, Inosin, N6-Isopentenyladenin, 1-Methylguanin, 1-Methylinosin, 2,2-Dimethylguanin, 2-Methyladenin, 2-Methylguanin, 3-Methylcytosin, 5-Methylcytosin, N6-Adenin, 7-Methylguanin, 5-Methylaminomethyluracil, 5-Methoxyaminomethyl-2-thiouracil, Beta-D-Mannosylqueosin, 5'-Methoxycarboxymethyluracil, 5-Methoxyuracil, 2-Methylthio-N6-isopentyladenin, Uracil-5-oxyessigsäure (v), Wybutoxosin, Pseudouracil, Queosin, 2-Thiocytosin, 5-Methyl-2-thiouracil, 2-Thiouracil, 4-Thiouracil, 5-Methyluracil, Uracil-5-oxyessigsäuremethylester, Uracil-5-oxyessigsäure (v), 5-Methyl-2-thiouracil, 3-(3-Amino-3-N-2-carboxypropyl)uracil, (acp3)w und 2,6-Diaminopurin. Die Antisense-Nukleinsäure kann ersatzweise biologisch hergestellt werden, indem ein Expressionsvektor verwendet wird, in den eine Nukleinsäure in Antisense-Richtung subkloniert worden ist (d.h. RNA, die von der eingebrachten Nukleinsäure transkribiert wird, ist zu einer Ziel-nukleinsäure von Interesse in Antisense-Richtung orientiert, was im nachstehenden Unterabschnitt weiter beschrieben ist).
- Die erfindungsgemäßen Antisense-Nukleinsäuremoleküle werden üblicherweise an eine Zelle verabreicht oder in situ erzeugt, so daß sie mit der zellulären mRNA und/oder der genomischen DNA, die ein MCT-Protein codiert, hybridisieren oder daran binden, so daß die Expression des Proteins, bspw. durch Hemmung der Transkription und/oder Translation, gehemmt wird. Die Hybridisierung kann durch herkömmliche Nukleotid-Komplementarität unter Bildung eines stabilen Duplexes oder bspw. im Fall eines Antisense-Nukleinsäure-

32

- moleküls, das DNA-Duplices bindet, durch spezifische Wechselwirkungen in der großen Furche der Doppelhelix erfolgen. Das Antisense-Molekül kann so modifiziert werden, daß es spezifisch an einen Rezeptor oder an ein Antigen bindet, das auf einer ausgewählten Zelloberfläche exprimiert wird, bspw. durch Verknüpfen des Antisense-Nukleinsäuremoleküls an ein Peptid oder einen Antikörper, der an einen Zelloberflächenrezeptor oder Antigen bindet. Das Antisense-Nukleinsäuremolekül kann ebenfalls an Zellen verabreicht werden, wobei die hier beschriebenen Vektoren verwendet werden. Zur Erzielung hinreichender intrazellulärer Konzentrationen der Antisense-Moleküle sind Vektorkonstrukte, in denen sich das Antisense-Nukleinsäuremolekül unter der Kontrolle eines starken Pol-II- oder Pol-III-Promotors befindet, bevorzugt.
- 15 In einer weiteren Ausführungsform ist das erfindungsgemäße Antisense-Nukleinsäuremolekül ein α -anomerer Nukleinsäuremolekül. Ein α -anomerer Nukleinsäuremolekül bildet spezifische doppelsträngige Hybride mit komplementärer RNA, wobei die Stränge im Gegensatz zu gewöhnlichen β -Einheiten parallel zueinander verlaufen. (Gaultier et al., (1987) Nucleic Acids Res. 15:6625-6641). Das Antisense-Nukleinsäuremolekül kann zudem ein 2'-o-Methylribonukleotid (Inoue et al., (1987) Nucleic Acids Res. 15:6131-6148) oder ein chimäres RNA-DNA-Analogon (Inoue et al. (1987) FEBS Lett. 215:327-330) umfassen.
- 25 In einer weiteren Ausführungsform ist eine erfindungsgemäße Antisense-Nukleinsäure ein Ribozym. Ribozyme sind katalytische RNA-Moleküle mit Ribonukleaseaktivität, die eine einzelsträngige Nukleinsäure, wie eine mRNA, spalten können, zu der sie einen komplementären Bereich haben. Somit können Ribozyme (z.B. Hammerhead-Ribozyme (beschrieben in Haselhoff und Gerlach (1988) Nature 334:585-591)) zur katalytischen Spaltung von MCT-mRNA-Transkripten verwendet werden, um dadurch die Translation der MCT-mRNA zu hemmen. Ein Ribozym mit Spezifität für eine MCT-codierende Nukleinsäure kann auf der Basis der Nukleotidsequenz einer hier offenbaren MCT-cDNA (d.h. RXA00001 in Anhang A) aufgebaut werden. Bspw. kann ein Derivat einer Tetrahymena-L-19-IVS-RNA konstruiert werden, wobei die Nukleotidsequenz der aktiven Stelle komplementär zur Nukleotidsequenz ist, die in einer MCT-codierenden mRNA gespalten werden soll. S. bspw. Cech et al., US-Patent Nr. 4 987 071 und Cech et al., US-Patent Nr. 5 116 742. Alternativ kann MCT-mRNA zur Selektion einer katalytischen RNA mit spezifischer Ribonukleaseaktivität aus einem Pool von RNA-Molekülen verwendet werden. Siehe bspw. Bartel, D., und Szostak, J.W. (1993) Science 261: 1411-1418.

33

Die MCT-Genexpression läßt sich alternativ hemmen, indem Nukleotidsequenzen, die komplementär zum regulatorischen Bereich einer MCT-Nukleotidsequenz sind (bspw. ein MCT-Promotor und/oder -Enhancer) so dirigiert werden, daß Triple-Helixstrukturen gebildet werden, die die Transkription eines MCT-Gens in Ziel-Zellen verhindern. Siehe allgemein Helene, C. (1991) Anticancer Drug Res. 6(6) 569-584; Helene, C. et al., (1992) Ann. N. Y. Acad. Sci. 660: 27-36; und Maher. L.J. (1992) Bioassays 14(12) 807-815.

10 B. *Rekombinante Expressionsvektoren und Wirtszellen*

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Vektoren, vorzugsweise Expressionsvektoren, die eine Nukleinsäure enthalten, die ein MCT-Protein (oder einen Abschnitt davon) codieren. Wie hier verwendet betrifft der Begriff "Vektor" ein Nukleinsäuremolekül, das eine andere Nukleinsäure transportieren kann, an welche es gebunden ist. Ein Vektortyp ist ein "Plasmid", was für eine zirkuläre doppelsträngige DNA-Schleife steht, in die zusätzlichen DNA-Segmente ligiert werden können. Ein weiterer Vektortyp ist ein viraler Vektor, wobei zusätzliche DNA-Segmente in das virale Genom ligiert werden können. Bestimmte Vektoren können in einer Wirtszelle, in die sie eingebracht worden sind, autonom replizieren (bspw. Bakterienvektoren, mit bakteriellem Replikationsursprung und episomale Säugetiervektoren). Andere Vektoren (z.B. nicht-episomale Säugetiervektoren) werden in das Genom einer Wirtszelle beim Einbringen in die Wirtszelle integriert und dadurch zusammen mit dem Wirtsgenom repliziert. Zudem können bestimmte Vektoren die Expression von Genen, mit denen sie funktionsfähig verbunden sind, steuern. Diese Vektoren werden als "Expressionsvektoren" bezeichnet. Gewöhnlich haben die Expressionsvektoren, die bei DNA-Rekombinationstechniken verwendet werden, die Form von Plasmiden. In der vorliegenden Beschreibung können "Plasmid" und "Vektor" austauschbar verwendet werden, da das Plasmid die am häufigsten verwendete Vektorform ist. Die Erfindung soll diese anderen Expressionsvektorformen, wie virale Vektoren (bspw. replikationsdefiziente Retroviren, Adenoviren und adenoverwandte Viren), die ähnliche Funktionen ausüben, umfassen.

Der erfindungsgemäße rekombinante Expressionsvektor umfaßt eine erfindungsgemäße Nukleinsäure in einer Form, die sich zur Expression der Nukleinsäure in einer Wirtszelle eignet, was bedeutet, daß die rekombinanten Expressionsvektoren eine oder mehrere regulatorische Sequenzen, ausgewählt auf der Basis der zur Expression zu verwendenden Wirtszellen, die mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz funktionsfähig verbunden ist, umfaßt. In einem rekombinanten Expressionsvektor bedeutet "funktionsfähig verbunden", daß die Nukleotidsequenz von Interesse derart an die

34

- regulatorische(n) Sequenz(en) gebunden ist, daß die Expression der Nukleotidsequenz möglich ist (bspw. in einem In-vitro-Transkriptions-/Translationssystem oder in einer Wirtszelle, wenn der Vektor in die Wirtszelle eingebracht ist). Der Begriff
- 5 "regulatorische Sequenz" soll Promotoren, Enhancer und andere Expressionskontrollelemente (bspw. Polyadenylierungssignale) umfassen. Diese regulatorischen Sequenzen sind bspw. beschrieben in Goeddel: Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Regulatorische Sequenzen
- 10 umfassen solche, die die konstitutive Expression einer Nukleotidsequenz in vielen Wirtszelltypen steuern, und solche, die die direkte Expression der Nukleotidsequenz nur in bestimmten Wirtszellen steuern. Der Fachmann ist sich dessen bewußt, daß die Gestaltung eines Expressionsvektors von Faktoren abhängen kann,
- 15 wie der Wahl der zu transformierenden Wirtszelle, dem Ausmaß der Expression des gewünschten Proteins usw. Die erfindungsgemäßen Expressionsvektoren können in die Wirtszellen eingebracht werden, so daß dadurch Proteine oder Peptide, einschließlich Fusionsproteinen oder -peptiden, die von den Nukleinsäuren, wie hier
- 20 beschrieben, codiert werden, hergestellt werden (bspw. MCT-Proteine, mutierte Formen von MCT-Proteinen, Fusionsproteine, usw.).

- Die erfindungsgemäßen rekombinanten Expressionsvektoren können zur Expression von MCT-Proteinen in prokaryotischen oder eukaryotischen Zellen ausgestaltet sein. Bspw. können MCT-Gene in
- 25 bakteriellen Zellen, wie *C. glutamicum*, Insektenzellen (mit Baculovirus-Expressionsvektoren), Hefe- und anderen Pilzzellen (siehe Romanos, M.A. et al. (1992) "Foreign gene expression in yeast: a review", Yeast 8: 423-488; van den Hondel, C.A.M.J.J. et
- 30 al. (1991) "Heterologous gene expression in filamentous fungi" in: More Gene Manipulations in Fungi, J.W. Bennet & L.L. Lasure, Hrsg., S. 396-428: Academic Press: San Diego; und van den Hondel, C.A.M.J.J. & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi. in: Applied Molecular Genetics
- 35 of Fungi, Peberdy, J.F. et al., Hrsg, S. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge), Algen- und vielzelligen Pflanzenzellen (siehe Schmidt, R. und Willmitzer, L. (1988) "High efficiency *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* leaf and cotyledon explants" Plant Cell
- 40 Rep.: 583-586) oder Säugetierzellen exprimiert werden. Geeignete Wirtszellen werden weiter erörtert in Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Der rekombinante Expressionsvektor kann alternativ, bspw. mit T7-Promotorregulatorischen Sequenzen und T7-Polymerase,
- 45 in vitro transkribiert und translatiert werden.

35

Die Expression von Proteinen in Prokaryonten erfolgt meist mit Vektoren, die konstitutive oder induzierbare Promotoren enthalten, die die Expression von Fusions- oder Nicht-Fusionsproteinen steuern. Fusionsvektoren steuern eine Reihe von Aminosäuren zu einem darin codierten Protein, gewöhnlich am Aminoterminus des rekombinanten Proteins, bei. Diese Fusionsvektoren haben gewöhnlich drei Aufgaben: 1) die Verstärkung der Expression von rekombinantem Protein; 2) die Erhöhung der Löslichkeit des rekombinanten Proteins; und 3) die Unterstützung der Reinigung des rekombinanten Proteins durch Wirkung als Ligand bei der Affinitätsreinigung. Bei Fusions-Expressionsvektoren wird oft eine proteolytische Spaltstelle an der Verbindungsstelle der Fusionseinheit und des rekombinanten Proteins eingebracht, so daß die Trennung des rekombinanten Proteins von der Fusionseinheit nach der Reinigung des Fusionsproteins möglich ist. Diese Enzyme und ihre entsprechenden Erkennungssequenzen umfassen Faktor Xa, Thrombin und Enterokinase.

Übliche Fusionsexpressionsvektoren umfassen pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith, D.B. und Johnson, K.S. (1988) Gene 67: 31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) und pRIT 5 (Pharmacia, Piscataway, NJ), bei denen Glutathion-S-Transferase (GST), Maltose E-bindendes Protein bzw. Protein A an das rekombinante Zielprotein fusioniert wird. Bei einer Ausführungsform ist die codierende Sequenz des MCT-Proteins in einen pGEX-Expressionsvektor kloniert, so daß ein Vektor erzeugt wird, der ein Fusionsprotein codiert, umfassend vom N-Terminus zum C-Terminus, GST - Thrombin-Spaltstelle - X-Protein. Das Fusionsprotein kann durch Affinitätschromatographie mittels Glutathion-Agarose-Harz gereinigt werden. Das rekombinante MCT-Protein, das nicht mit GST fusioniert ist, kann durch Spaltung des Fusionsproteins mit Thrombin gewonnen werden.

Beispiele geeigneter induzierbarer Nicht-Fusions-Expressionsvektoren aus E. coli umfassen pTrc (Amann et al., (1988) Gene 69: 301 - 315) und pET 11d (Studier et al. Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Kalifornien (1990) 60-89). Die Zielgenexpression aus dem pTrc-Vektor beruht auf der Transkription durch Wirts-RNA-Polymerase von einem Hybrid-trp-lac-Fusionspromotor. Die Zielgenexpression aus dem pET11d-Vektor beruht auf der Transkription von einem T7-gn10-lac-Fusions-Promotor, die von einer coexprimierten viralen RNA-Polymerase (T7 gn1) vermittelt wird. Diese virale Polymerase wird von den Wirtsstämmen BL 21 (DE3) oder HMS174 (DE3) von einem residenten λ -Prophagen geliefert, der ein T7

36

gn1-Gen unter der Transkriptionskontrolle des lacUV 5-Promotors birgt.

- Eine Strategie zur Maximierung der Expression des rekombinanten
- 5 Proteins ist die Expression des Proteins in einem Wirtsbakterium, dessen Fähigkeit zur proteolytischen Spaltung des rekombinanten Proteins gestört ist (Gottesman, S. Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Kalifornien (1990) 119-128). Eine weitere Strategie ist die Veränderung der
- 10 Nukleinsäuresequenz der in einen Expressionsvektor zu inserierenden Nukleinsäure, so daß die einzelnen Codons für jede Aminosäure diejenigen sind, die vorzugsweise in einem zur Expression ausgewählten Bakterium, wie *C. glutamicum*, verwendet werden (Wada et al. (1992) Nucleic Acids Res. 20: 2111 - 2118). Diese Veränderung
- 15 der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen erfolgt durch Standard-DNA-Synthesetechniken.

- Bei einer weiteren Ausführungsform ist der MCT-Proteinexpressionsvektor ein Hefe-Expressionsvektor. Beispiele für Vektoren
- 20 zur Expression in der Hefe *S. cerevisiae* umfassen pYepSec1 (Baldari et al., (1987) Embo J. 6: 229-234), pMFa (Kurjan und Herskowitz (1982) Cell 30: 933-943), pJRY88 (Schultz et al. (1987) Gene 54: 113 - 123) sowie pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Vektoren und Verfahren zur Konstruktion von Vek-
- 25 toren, die sich zur Verwendung in anderen Pilzen, wie filamentösen Pilzen, eignen, umfassen diejenigen, die eingehend beschrieben sind in: van den Hondel, C.A.M.J.J. & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi, in: Applied Molecular Genetics of fungi, J.F. Peberdy et al.,
- 30 Hrsg., S. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge.

- Alternativ können die erfindungsgemäßen MCT-Proteine in Insektenzellen unter Verwendung von Baculovirus-Expressionsvektoren exprimiert werden. Baculovirus-Vektoren, die zur Expression von
- 35 Proteinen in gezüchteten Insektenzellen (bspw. Sf9-Zellen) verfügbar sind, umfassen die pAc-Reihe (Smith et al., (1983) Mol. Cell Biol. 3: 2156-2165) und die pVL-Reihe (Lucklow und Summers (1989) Virology 170: 31-39).

- 40 In einer weiteren Ausführungsform können die erfindungsgemäßen MCT-Proteine in einzelligen Pflanzenzellen (wie Algen) oder in Pflanzenzellen höherer Pflanzen (bspw. Spermatophyten, wie Feldfrüchte) exprimiert werden. Beispiele für Pflanzen-Expressionsvektoren umfassen solche, die eingehend beschrieben sind in:
- 45 Becker, D., Kemper, E., Schell, J. und Masterson, R. (1992) "New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left border", Plant Mol. Biol. 20: 1195-1197; und Bevan, M.W.

37

(1984) "Binary Agrobacterium vectors for plant transformation", Nucl. Acids Res. 12: 8711-8721.

In einer weiteren Ausführungsform wird eine erfindungsgemäße
5 Nukleinsäure in Säugetierzellen mit einem Säugetier-Expressionsvektor exprimiert.. Beispiele für Säugetier-Expressionsvektoren umfassen pCDM8 (Seed, B. (1987) Nature 329:840) und pMT2PC (Kaufman et al. (1987) EMBO J. 6: 187-195). Bei der Verwendung in Säugetierzellen werden die Kontrollfunktionen des Expressions-
10 vektors oft von viralen regulatorischen Elementen bereitgestellt. Gemeinhin verwendete Promotoren stammen bspw. aus Polyoma, Adenovirus2, Cytomegalievirus und Simian Virus 40. Für weitere geeignete Expressionssysteme für prokaryotische und eukaryotische Zellen, siehe die Kapitel 16 und 17 aus Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T., Molecular cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

Bei einer weiteren Ausführungsform kann der rekombinante Säugetier-Expressionsvektor die Expression der Nukleinsäure vorzugsweise in einem bestimmten Zelltyp bewirken (bspw. werden gewebespezifische regulatorische Elemente zur Expression der Nukleinsäure verwendet). Gewebespezifische regulatorische Elemente sind im Fachgebiet bekannt. Nicht-einschränkende Beispiele für geeignete gewebespezifische Promotoren umfassen den Albuminpromotor (leberspezifisch; Pinkert et al. (1987) Genes Dev. 1: 268-277), lymphoid-spezifische Promotoren (Calame und Eaton (1988) Adv. Immunol. 43: 235-275), insbesondere Promotoren von T-Zellrezeptoren (Winoto und Baltimore (1989) EMBO J. 8: 729-733) und Immunoglobulinen (Banerji et al. (1983) Cell 33: 729-740; Queen und Baltimore (1983) Cell 33: 741-748), neuronspezifische Promotoren (bspw. Neurofilament-Promotor; Byrne und Ruddie (1989) PNAS 86: 5473-5477), pankreasspezifische Promotoren (Edlund et al., (1985) Science 230: 912-916) und milchdrüsenspezifische Promotoren
35 (bspw. Milchserum-Promotor; US-Patent Nr. 4 873 316 und europäische Patentanmeldungsveröffentlichung Nr. 264 166). Entwicklungsregulierte Promotoren sind ebenfalls umfaßt, bspw. die Maus-hox-Promotoren (Kessel und Gruss (1990) Science 249: 374-379) und der α -Fetoprotein-Promotor (Campes und Tilghman (1989) Genes Dev. 3: 537-546).
40

Die Erfindung stellt zudem einen rekombinanten Expressionsvektor bereit, umfassend ein erfindungsgemäßes DNA Molekül, das in Antisense-Richtung in den Expressionsvektor kloniert ist. Dies
45 bedeutet, daß das DNA-Molekül derart mit einer regulatorischen Sequenz funktionsfähig verbunden ist, daß die Expression (durch Transkription des DNA-Moleküls) eines RNA-Moleküls, das zur MCT-

38

mRNA antisense ist, möglich ist. Es können regulatorische Sequenzen ausgewählt werden, die funktionsfähig an eine in Antisense-Richtung klonierte Nukleinsäure gebunden sind und die die kontinuierliche Expression des Antisense-RNA-Moleküls in einer Vielzahl von Zelltypen steuern, bspw. können virale Promotoren und/oder Enhancer oder regulatorische Sequenzen ausgewählt werden, die die konstitutive, gewebespezifische oder zelltypspezifische Expression von Antisense-RNA steuern. Der Antisense-Expressionsvektor kann in Form eines rekombinanten Plasmids, Phagemids oder

5
10
15

attenuierten Virus vorliegen, in dem Antisense-Nukleinsäuren unter der Kontrolle eines hochwirksamen regulatorischen Bereichs produziert werden, dessen Aktivität durch den Zelltyp bestimmt wird, in den der Vektor eingebracht wird. Für eine Diskussion der Regulation der Genexpression mittels Antisense-Genen, siehe Weintraub, H. et al., Antisense-RNA as a molecular tool for genetic analysis, Reviews - Trends in Genetics, Bd. 1(1) 1986.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft die Wirtszellen, in die ein erfindungsgemäßer rekombinanter Expressionsvektor eingebracht worden ist. Die Begriffe "Wirtszelle" und "rekombinante Wirtszelle" werden hier untereinander austauschbar verwendet. Es ist selbstverständlich, daß diese Begriffe nicht nur eine bestimmte Zielzelle, sondern auch die Nachkommen oder potentiellen Nachkommen dieser Zelle betreffen. Da in aufeinanderfolgenden Generationen aufgrund von Mutation oder Umwelteinflüssen bestimmte Modifikationen auftreten können, sind diese Nachkommen nicht unbedingt mit der Parentalzelle identisch, sind jedoch im Umfang des Begriffs, wie er hier verwendet wird, noch umfaßt.

20
25

30 Eine Wirtszelle kann eine prokaryotische oder eukaryotische Zelle sein. Bspw. kann ein MCT-Protein in Bakterienzellen, wie *C. glutamicum*, Insektenzellen, Hefe- oder Säugetierzellen (wie Ovarzellen des chinesischen Hamsters (CHO) oder COS-Zellen) exprimiert werden. Andere geeignete Wirtszellen sind dem Fachmann geläufig.

35 Mikroorganismen, die mit *Corynebacterium glutamicum* verwandt sind und sich geeignet als Wirtszellen für die erfindungsgemäßen Nukleinsäure- und Proteinmoleküle verwenden lassen, sind in Tabelle 3 aufgeführt.

40 Durch herkömmliche Transformations- oder Transfektionsverfahren läßt sich Vektor-DNA in prokaryotische oder eukaryotische Zellen einbringen. Die Begriffe "Transformation" und "Transfektion", "Konjugation" und "Transduktion" wie sie hier verwendet werden, sollen eine Vielzahl von im Stand der Technik bekannten Verfahren

45

zum Einbringen fremder Nukleinsäure (bspw. DNA) in eine Wirtszelle umfassen, einschließlich Calciumphosphat- oder Calciumchlorid-Copräzipitation, DEAE-Dextran-vermittelte Transfektion,

39

- Lipofektion oder Elektroporation. Geeignete Verfahren zur Transformation oder Transfektion von Wirtszellen lassen sich nachlesen in Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2. Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) und anderen Labor-Handbüchern.

- Für die stabile Transfektion von Säugetierzellen ist bekannt, daß je nach verwendetem Expressionsvektor und verwendeter Transfektionstechnik nur ein kleiner Teil der Zellen die fremde DNA in ihr Genom integriert. Zur Identifizierung und Selektion dieser Integran-
10 ten wird gewöhnlich ein Gen, das einen selektierbaren Marker (z.B. Resistenz gegen Antibiotika) codiert, zusammen mit dem Gen von Interesse in die Wirtszellen eingebracht. Bevorzugte selek-
15 tierbare Marker umfassen solche, die die Resistenz gegen Medikamente, wie G418, Hygromycin und Methotrexat, verleihen. Eine Nukleinsäure, die einen selektierbaren Marker codiert, kann in eine Wirtszelle auf dem gleichen Vektor eingebracht werden, wie derje-
20 nige, der ein MCT-Protein codiert, oder kann auf einem gesonderten Vektor eingebracht werden. Zellen, die mit der eingebrachten Nukleinsäure stabil transfiziert worden sind, können durch Medikamentenselektion identifiziert werden (z.B. Zellen, die den selektierbaren Marker integriert haben, überleben, wohingegen die anderen Zellen sterben).

25

- Zur Erzeugung eines homolog rekombinierten Mikroorganismus wird ein Vektor hergestellt, der zumindest einen Abschnitt eines MCT-Gens enthält, in den eine Deletion, Addition oder Substitution eingebracht worden ist, um das MCT-Gen zu verändern, bspw. funk-
30 tionell zu disruptieren. Dieses MCT-Gen ist vorzugsweise ein *Corynebacterium glutamicum*-MCT-Gen, jedoch kann ein Homologon von einem verwandten Bakterium oder sogar von einer Säugetier-, Hefe- oder Insektenquelle verwendet werden. Bei einer bevorzugten Ausführungsform ist der Vektor derart ausgestaltet, daß das endogene
35 MCT-Gen bei homologer Rekombination funktionell disruptiert ist (d.h. nicht länger ein funktionelles Protein codiert, ebenfalls bezeichnet als "Knockout"-Vektor). Der Vektor kann alternativ derart ausgestaltet sein, daß das endogene MCT-Gen bei homologer Rekombination mutiert oder anderweitig verändert ist, jedoch noch
40 das funktionelle Protein codiert (z.B. kann der stromaufwärts gelegene regulatorische Bereich derart verändert sein, daß dadurch die Expression des endogenen MCT-Proteins verändert wird.). Der veränderte Abschnitt des MCT-Gens ist im homologen Rekombinationsvektor an seinem 5'- und 3'-Ende von zusätzlicher Nukleinsäure
45 des MCT-Gens flankiert, die eine homologe Rekombination zwischen dem exogenen MCT-Gen, das von dem Vektor getragen wird, und einem endogenen MCT-Gen in einem Mikroorganismus, ermöglicht. Die zu-

40

sätzliche flankierende MCT-Nukleinsäure ist für eine erfolgreiche homologe Rekombination mit dem endogenen Gen hinreichend lang. Gewöhnlich enthält der Vektor mehrere Kilobasen flankierende DNA (sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende) (siehe z.B. Thomas, K.R. und
5 Capecchi, M.R. (1987) Cell 51: 503 für eine Beschreibung von homologen Rekombinationsvektoren). Der Vektor wird in einen Mikroorganismus (z.B. durch Elektroporation) eingebracht, und Zellen, in denen das eingebrachte MCT-Gen mit dem endogenen MCT-Gen homolog rekombiniert ist, werden unter Verwendung im Fachgebiet be-
10 kannter Verfahren selektiert.

Bei einer anderen Ausführungsform können rekombinante Mikroorganismen produziert werden, die ausgewählte Systeme enthalten, die eine regulierte Expression des eingebrachten Gens ermöglichen.
15 Der Einschluß eines MCT-Gens in einem Vektor unter der Kontrolle des Lac-Operons ermöglicht z.B. die Expression des MCT-Gens nur in Gegenwart von IPTG. Diese regulatorischen Systeme sind im Fachgebiet bekannt.

20 Eine erfindungsgemäße Wirtszelle, wie eine prokaryotische oder eukaryotische Wirtszelle in Kultur, kann zur Produktion (d.h. Expression) eines MCT-Proteins verwendet werden. Die Erfindung stellt zudem Verfahren zur Produktion von MCT-Proteinen unter Verwendung der erfindungsgemäßen Wirtszellen bereit. Bei einer
25 Ausführungsform umfaßt das Verfahren die Anzucht der erfindungsgemäßen Wirtszelle (in die ein rekombinanter Expressionsvektor, der ein MCT-Protein codiert, eingebracht worden ist, oder in deren Genom ein Gen eingebracht worden ist, das ein Wildtyp- oder verändertes MCT-Protein codiert) in einem geeigneten Medium, bis
30 das MCT-Protein produziert worden ist. Das Verfahren umfaßt in einer weiteren Ausführungsform das Isolieren der MCT-Proteine aus dem Medium oder der Wirtszelle.

C. Isolierte MCT-Proteine

35 Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft isolierte MCT-Proteine und biologisch aktive Abschnitte davon. Ein "isoliertes" oder "gereinigtes" Protein oder biologisch aktiver Abschnitt davon ist im Wesentlichen frei von zellulärem Material, wenn es durch DNA-
40 Rekombinationstechniken produziert wird, oder von chemischen Vorstufen oder andern Chemikalien, wenn es chemisch synthetisiert wird. Der Begriff "im Wesentlichen frei von zellulärem Material" umfaßt MCT-Proteinpräparationen, in denen das Protein von zellulären Komponenten der Zellen, in denen es natürlich oder rekombi-
45 nant produziert wird, getrennt ist. Bei einer Ausführungsform umfaßt der Ausdruck "im Wesentlichen frei von zellulärem Material" MCT-Proteinpräparationen mit weniger als etwa 30% (bezogen auf

41

das Trockengewicht) Nicht-MCT-Protein (ebenfalls als "kontaminierendes Protein" bezeichnet), stärker bevorzugt weniger als etwa 20%, noch stärker bevorzugt weniger als etwa 10% und am stärksten bevorzugt weniger als etwa 5% Nicht-MCT-Protein. Das MCT-Protein oder ein biologisch aktiver Abschnitt davon enthält nach rekombinanter Produktion im Wesentlichen kein Kulturmedium, d.h. das Kulturmedium macht weniger als etwa 20%, stärker bevorzugt weniger als etwa 10% und am stärksten bevorzugt weniger als etwa 5% des Volumens der Proteinpräparation aus. Der Begriff "im Wesentlichen frei von chemischen Vorstufen oder anderen Chemikalien" umfaßt MCT-Proteinpräparationen, in denen das Protein von chemischen Vorstufen oder anderen Chemikalien getrennt ist, die an der Synthese des Proteins beteiligt sind. Bei einer Ausführungsform umfaßt der Begriff "im Wesentlichen frei von chemischen Vorstufen oder anderen Chemikalien" MCT-Proteinpräparationen mit weniger als etwa 30% (bezogen auf das Trockengewicht), stärker bevorzugt weniger als etwa 20%, noch stärker bevorzugt weniger als etwa 10% und am stärksten bevorzugt weniger als etwa 5% chemische Vorstufen oder Nicht-MCT-Chemikalien. In bevorzugten Ausführungsformen weisen die isolierten Proteine oder biologisch aktiven Abschnitte davon keine kontaminierenden Proteine aus dem gleichen Organismus auf, aus dem das MCT-Protein abstammt. Diese Proteine werden gewöhnlich hergestellt durch rekombinante Expression bspw. eines *C. glutamicum*-MCT-Proteins in einem Mikroorganismus, wie *C. glutamicum*.

Ein erfindungsgemäßes isoliertes MCT-Protein oder ein Abschnitt davon kann am Metabolismus von Verbindungen, die für den Aufbau der Zellmembran in *C. glutamicum* nötig sind, oder am Transport der Moleküle über diese Membranen, beteiligt sein, oder hat eine oder mehrere der in Tabelle 1 angegebenen Aktivitäten. In bevorzugten Ausführungsformen umfaßt das Protein oder ein Abschnitt davon eine Aminosäuresequenz, die zu einer Aminosäuresequenz aus Anhang B hinreichend homolog ist, daß das Protein oder der Abschnitt davon am Metabolismus von Verbindungen, die für den Aufbau der Zellmembran in *C. glutamicum* nötig sind, oder am Transport der Moleküle über diese Membranen, beteiligt sein kann. Der Abschnitt des Proteins ist vorzugsweise ein biologisch aktiver Abschnitt, wie hier beschrieben. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform hat ein erfindungsgemäßes MCT-Protein eine der in Anhang B gezeigten Aminosäuresequenzen. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform hat das MCT-Protein eine Aminosäuresequenz, die von einer Nukleotidsequenz codiert wird, die, bspw. unter stringenten Bedingungen, an eine Nukleotidsequenz von Anhang A hybridisiert. In noch einer weiteren bevorzugten Ausführungsform hat das MCT-Protein eine Aminosäuresequenz, die von einer Nukleotidsequenz codiert wird und die mindestens etwa 50-60%,

42

vorzugsweise mindestens etwa 60-70%, stärker bevorzugt mindestens etwa 70-80%, 80-90%, 90-95% und noch stärker bevorzugt mindestens etwa 96%, 97%, 98%, 99% oder noch homologer zu einer der Aminosäuresequenzen von Anhang B ist. Die erfindungsgemäßen bevorzug-

5 ten MCT-Proteine besitzen vorzugsweise ebenfalls mindestens eine der hier beschriebenen MCT-Aktivitäten. Ein erfindungsgemäßes bevorzugtes MCT-Protein umfaßt eine Aminosäuresequenz, die von einer Nukleotidsequenz codiert wird, die, bspw. unter stringenten

10 Bedingungen, mit einer Nukleotidsequenz von Anhang A hybridisiert, und die am Metabolismus von Verbindungen, die für den Aufbau der Zellmembran in *C. glutamicum* nötig sind, oder am Transport der Moleküle über diese Membranen, beteiligt sein kann, oder die eine oder mehrere der in Tabelle 1 angegebenen Aktivitäten aufweist.

15

Bei weiteren Ausführungsformen ist das MCT-Protein im Wesentlichen homolog zu einer Aminosäuresequenz von Anhang B und behält die funktionelle Aktivität des Proteins von einer der Sequenzen aus Anhang B, und unterscheidet sich dennoch in der Aminosäure-

20 sequenz aufgrund der natürlichen Variation oder Mutagenese, wie eingehend beschrieben in Unterabschnitt I oben. In einer weiteren Ausführungsform umfaßt das MCT-Protein eine Aminosäuresequenz, die mindestens etwa 50-60%, vorzugsweise mindestens etwa 60-70%, stärker bevorzugt mindestens etwa 70-80%, 80-90%, 90-95% und am

25 stärksten bevorzugt mindestens etwa 96%, 97%, 98%, 99% oder noch homologer zu einer vollständigen Aminosäuresequenz aus Anhang B ist und die zumindest eine der hier beschriebenen MCT-Aktivitäten aufweist. Bei einer anderen Ausführungsform betrifft die Erfindung ein *C. glutamicum*-Vollängenprotein, das im Wesentlichen ho-

30 molog zu einer vollständigen Aminosäuresequenz aus Anhang B ist.

Biologisch aktive Abschnitte eines MCT-Proteins umfassen Peptide mit Aminosäuresequenzen, die von der Aminosäuresequenz eines MCT-Proteins hergeleitet sind, bspw. eine in Anhang B gezeigte Amino-

35 säuresequenz oder die Aminosäuresequenz eines Proteins, das zu einem MCT-Protein homolog ist, die weniger Aminosäuren als das Vollängen-MCT-Protein oder das Vollängenprotein aufweisen, das zu einem MCT-Protein homolog ist, und zumindest eine Aktivität eines MCT-Proteins aufweisen. Gewöhnlich umfassen biologisch aktive Ab-

40 schnitte (Peptide, bspw. Peptide, die bspw 5, 10, 15, 20, 30, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 50, 100 oder mehr Aminosäuren lang sind) eine Domäne oder ein Motiv mit mindestens einer Aktivität eines MCT-Proteins. Überdies können andere biologisch aktive Abschnitte, in denen andere Bereiche des Proteins deletiert sind, durch rekombi-

45 nante Techniken hergestellt werden und bezüglich einer oder mehrerer der hier beschriebenen Aktivitäten untersucht werden. Die biologisch aktiven Abschnitte eines MCT-Proteins umfassen vor-

43

zugsweise ein oder mehrere ausgewählte Domänen/Motive oder Abschnitte davon mit biologischer Aktivität.

- MCT-Proteine werden vorzugsweise durch DNA-Rekombinationstechniken hergestellt. Bspw wird. ein Nukleinsäuremolekül, das das Protein codiert, in einen Expressionsvektor (wie vorstehend beschrieben) kloniert, der Expressionsvektor wird in eine Wirtszelle (wie vorstehend beschrieben) eingebracht, und das MCT-Protein wird in der Wirtszelle exprimiert. Das MCT-Protein kann dann
- 10 durch ein geeignetes Reinigungsschema mittels Standard-Protein-Reinigungstechniken aus den Zellen isoliert werden. Alternativ zur rekombinanten Expression kann ein MCT-Protein, -Polypeptid, oder -Peptid mittels Standard-Peptidsynthesetechniken chemisch synthetisiert werden. Überdies kann natives MCT-Protein aus
- 15 Zellen (bspw. Endothelzellen) z.B. mit einem Anti-MCT-Antikörper isoliert werden, der durch Standardtechniken produziert werden kann, wobei ein erfindungsgemäßes MCT-Protein oder ein Fragment davon verwendet wird.
- 20 Die Erfindung stellt auch chimäre MCT-Proteine oder MCT-Fusionsproteine bereit. Wie hier verwendet, umfaßt ein "chimäres MCT-Protein" oder "MCT-Fusionsprotein" ein MCT-Polypeptid, das funktionsfähig an ein Nicht-MCT-Polypeptid gebunden ist. Ein "MCT-Polypeptid" betrifft ein Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz,
- 25 die MCT entspricht, wohingegen ein "Nicht-MCT-Polypeptid" ein Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz betrifft, die einem Protein entspricht, das im Wesentlichen nicht homolog zum MCT-Protein ist, z.B. ein Protein, das sich vom MCT-Protein unterscheidet und vom gleichen oder einem anderen Organismus herrührt.
- 30 Innerhalb des Fusionsproteins soll der Begriff "funktionsfähig verbunden" bedeuten, daß das MCT-Polypeptid und das Nicht-MCT-Polypeptid im Leseraster miteinander fusioniert sind. Das Nicht-MCT-Polypeptid kann an den N- oder C-Terminus des MCT-Polypeptides gebunden sein. Bei einer Ausführungsform ist das Fusionsprotein bspw. ein GST-MCT-Fusionsprotein, bei dem die MCT-Sequenzen an den C-Terminus der GST-Sequenz gebunden sind.. Diese Fusionsproteine können die Reinigung des rekombinanten MCT-Proteins erleichtern. Bei einer weiteren Ausführungsform ist das Fusionsprotein ein MCT-Protein, das eine heterologe Signalsequenz an seinem
- 40 N-Terminus aufweist. In bestimmten Wirtszellen (z.B. Säugetier-Wirtszellen) kann die Expression und/oder Sekretion eines MCT-Proteins durch Verwendung einer heterologen Signalsequenz gesteigert werden.
- 45 Ein erfindungsgemäßes chimäres MCT-Protein oder MCT-Fusionsprotein wird durch Standard-DNA-Rekombinationstechniken produziert. DNA-Fragmente, die unterschiedliche Polypeptidsequenzen codieren,

44

- werden gemäß herkömmlicher Techniken im Leseraster aneinander ligiert, bspw. durch Einsatz glatter oder überhängender Enden zur Ligation, Restriktionsenzymsspaltung zur Bereitstellung geeigneter Enden, Auffüllen kohäsiver Enden, falls erforderlich, Behandlung mit alkalischer Phosphatase, um ungewollte Verknüpfungen zu vermeiden, und enzymatische Ligierung. Bei einer weiteren Ausführungsform kann das Fusionsgen durch herkömmliche Techniken, einschließlich DNA-Syntheseautomaten, synthetisiert werden. Alternativ kann eine PCR-Amplifizierung von Genfragmenten mittels Ankerprimern durchgeführt werden, die komplementäre Überhänge zwischen aufeinanderfolgenden Genfragmenten erzeugen. Diese können anschließend miteinander hybridisiert und reamplifiziert werden, so daß eine chimäre Gensequenz erzeugt wird (s. bspw. Current Protocols in Molecular Biology, Hrsg. Ausubel et al., John Wiley & Sons: 1992). Überdies sind viele Expressionsvektoren kommerziell erhältlich, die schon eine Fusionseinheit codieren (bspw. ein GST-Polypeptid). Eine MCT-codierende Nukleinsäure kann in einen solchen Expressionsvektor kloniert werden, so daß die Fusionseinheit mit dem MCT-Protein im Leseraster verbunden ist.
- 20 Homologa des MCT-Proteins können durch Mutagenese erzeugt werden, z.B. durch bestimmte Punktmutation oder Verkürzung des MCT-Proteins. Der Begriff "Homologon", wie er hier verwendet wird, betrifft eine variante Form des MCT-Proteins, die als Agonist oder
- 25 Antagonist der MCT-Protein-Aktivität wirkt. Ein Agonist des MCT-Proteins kann im Wesentlichen die gleiche oder einen Teil der biologischen Aktivitäten des MCT-Proteins beibehalten. Ein Antagonist des MCT-Proteins kann eine oder mehrere Aktivitäten der natürlich vorkommenden Form des MCT-Proteins bspw. durch kompetitive Bindung an ein stromabwärts oder -aufwärts gelegenes Element der Stoffwechselkaskade für Zellmembrankomponenten, die das MCT-Protein umfaßt, oder durch Binden an eine MCT-Protein, das den Transport von Verbindungen über diese Membranen vermittelt, hemmen, wodurch verhindert wird, daß eine Translokation stattfindet.
- 35 Bei einer alternativen Ausführungsform können Homologa des MCT-Proteins durch Screening kombinatorischer Mutanten-Banken, bspw. Verkürzungsmutanten, des MCT-Proteins auf MCT-Protein-Agonisten- oder -Antagonisten-Aktivität identifiziert werden. Bei einer Aus-
- 40 führungsform wird eine variierte Bank von MCT-Varianten durch kombinatorische Mutagenese auf dem Nukleinsäure-Niveau erzeugt und von der variierten Genbank codiert. Eine variierte Bank von MCT-Varianten kann bspw durch enzymatisches Ligieren eines Gemisches synthetischer Oligonukleotide in die Gensequenzen her-
- 45 gestellt werden, so daß sich ein degenerierter Satz potentieller MCT-Sequenzen als individuelle Polypeptide oder alternativ als Satz größerer Fusionsproteine (z.B. Für Phage-Display), die die-

45

sen Satz von MCT-Sequenzen enthalten, exprimieren läßt. Es gibt eine Vielzahl von Verfahren, die zur Herstellung von Banken potentieller MCT-Homologa aus einer degenerierten Oligonukleotidsequenz verwendet werden können. Die chemische Synthese einer
5 degenerierten Gensequenz kann in einem DNA-Syntheseautomaten durchgeführt werden, und das synthetische Gen kann dann in den geeigneten Expressionsvektor ligiert werden. Die Verwendung eines degenerierten Gensatzes ermöglicht die Bereitstellung sämtlicher Sequenzen, die den gewünschten Satz an potentiellen MCT-Sequenzen
10 codieren, in einem Gemisch. Verfahren zur Synthese degenerierter Oligonukleotide sind im Fachgebiet bekannt (s. bspw. Narang, S.A. (1983) Tetrahedron 39: 3; Itakura et al. (1984) Annu. Rev. Biochem. 53: 323; Itakura et al., (1984) Science 198: 1056; Ike et al. (1983) Nucleic Acids Res. 11: 477).

15

Zusätzlich können Banken von Fragmenten der MCT-Protein-Codierung verwendet werden, um eine variierte Population von MCT-Fragmenten zum Screening und für die anschließende Selektion von Homologa eines MCT-Proteins zu erzeugen. Bei einer Ausführungsform
20 kann eine Bank codierender Sequenzfragmente erzeugt werden durch Behandeln eines doppelsträngigen PCR-Fragmentes einer codierenden MCT-Sequenz mit einer Nuklease unter Bedingungen, unter denen ein Nicking nur etwa einmal pro Molekül erfolgt, Denaturieren der doppelsträngigen DNA, Renaturieren der DNA unter Bildung doppelsträngiger DNA, die Sense-/Antisense-Paare von verschiedenen
25 genickten Produkten umfassen kann, Entfernen einzelsträngiger Abschnitte aus neu gebildeten Duplices durch Behandlung mit S1-Nuklease, und Ligieren der resultierenden Fragmentbank in einen Expressionsvektor. Durch dieses Verfahren kann eine
30 Expressionsbank hergeleitet werden, die N-terminale, C-terminale und interne Fragmente verschiedenen Größen des MCT-Proteins codiert.

Im Fachgebiet sind mehrere Techniken zum Screening von Genprodukten kombinatorischer Banken, die durch Punktmutationen oder Verkürzung hergestellt worden sind, und zum Screening von cDNA-Banken auf Genprodukte mit einer ausgewählten Eigenschaft, bekannt. Diese Techniken lassen sich an das schnelle Screening der Genbanken anpassen, die durch kombinatorische Mutagenese von
35 MCT-Homologa erzeugt worden sind. Die am häufigsten verwendeten Techniken zum Screening großer Genbanken, die einer Analyse mit hohem Durchsatz unterliegen, umfassen das Klonieren der Genbank in replizierbare Expressionsvektoren, Transformieren der geeigneten Zellen mit der resultierenden Vektorenbank und Exprimieren
40 der kombinatorischen Gene unter Bedingungen, unter denen der Nachweis der gewünschten Aktivität die Isolation des Vektors, der das Gen codiert, dessen Produkt nachgewiesen wurde, erleichtert.

46

Recursive Ensemble Mutagenese (REM), eine neue Technik, die die Häufigkeit funktioneller Mutanten in den Banken vergrößert, kann in Kombination mit den Screeningtests verwendet werden, um MCT-Homologa zu identifizieren (Arkin und Yourvan (1992) PNAS 89: 5 7811-7815; Delgrave et al. (1993) Protein Engineering 6(3): 327-331).

Bei einer weiteren Ausführungsform können zellbezogene Tests zur Analyse einer variierten MCT-Bank unter Verwendung von im Fach-
10 gebiet bekannten Verfahren verwendet werden.

D. Erfindungsgemäße Verwendungen und Verfahren

Die hier beschriebenen Nukleinsäuremoleküle, Proteine, Protein-
15 homologa, Fusionsproteine, Primer, Vektoren und Wirtszellen können in einem oder mehreren nachstehenden Verfahren verwendet werden: Identifikation von *C. glutamicum* und verwandten Organismen, Kartierung von Genomen von Organismen, die mit *C. glutamicum* verwandt sind, Identifikation und Lokalisation von *C. glutamicum*-Se-
20 quenzen von Interesse, Evolutionsstudien, Bestimmung von MCT-Proteinbereichen, die für die Funktion notwendig sind, Modulation der Aktivität eines MCT-Proteins; Modulation der Aktivität eines MCT-Wegs; und Modulation der zellulären Produktion einer gewünschten Verbindung, wie einer Feinchemikalie. Die erfindungsgemäßen MCT-Nukleinsäuremoleküle haben eine Vielzahl von Verwendun-
25 gen. Sie können zunächst zur Identifikation eines Organismus als *Corynebacterium glutamicum* oder naher Verwandten davon verwendet werden. Sie können zudem zur Identifikation von *C. glutamicum* oder eines Verwandten davon in einer Mischpopulation von Mikro-
30 organismen verwendet werden. Die Erfindung stellt die Nukleinsäuresequenzen einer Reihe von *C. glutamicum*-Genen bereit. Durch Sondieren der extrahierten genomischen DNA einer Kultur einer einheitlichen oder gemischten Population von Mikroorganismen unter stringenten Bedingungen mit einer Sonde, die einen Bereich
35 eines *C. glutamicum*-Gens umfaßt, das für diesen Organismus einzigartig ist, kann man bestimmen, ob dieser Organismus zugegen ist. *Corynebacterium glutamicum* selbst ist zwar nicht pathogen, jedoch ist es mit pathogenen Arten, wie *Corynebacterium diptheriae*, verwandt. Der Nachweis eines solchen Organismus ist von
40 signifikanter klinischer Bedeutung.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäure- und Proteinmoleküle können als Marker für spezifische Bereiche des Genoms dienen. Dies ist nicht nur beim Kartieren des Genoms, sondern auch für funktio-
45 nelle Studien von *C. glutamicum*-Proteinen nützlich. Zur Identifikation des Genombereichs, an den ein bestimmtes *C. glutamicum*-DNA-bindendes Protein bindet, kann das *C. glutamicum*-Genom bspw.

47

gespalten werden, und die Fragmente mit dem DNA-bindenden Protein inkubiert werden. Diejenigen, die das Protein binden, können zusätzlich mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekülen, vorzugsweise mit leicht nachweisbaren Markierungen, sondiert werden;

5 die Bindung eines solchen Nukleinsäuremoleküls an das Genomfragment ermöglicht die Lokalisation des Fragmentes auf der genomischen Karte von *C. glutamicum*, und wenn dies mehrmals mit unterschiedlichen Enzymen durchgeführt wird, erleichtert es eine rasche Bestimmung der Nukleinsäuresequenz, an die das Protein

10 bindet. Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle können zudem hinreichend homolog zu den Sequenzen verwandter Arten sein, so daß diese Nukleinsäuremoleküle als Marker für die Konstruktion einer genomischen Karte in verwandten Bakterien, wie *Brevibacterium lactofermentum*, dienen können.

15 Die erfindungsgemäßen MCT-Nukleinsäuremoleküle eignen sich ebenfalls für Evolutions- und Proteinstrukturuntersuchungen. Die Stoffwechsel- und Transportprozesse, an denen die erfindungsgemäßen Moleküle beteiligt sind, werden bei einer vielen prokaryotischen und eukaryotischen Zellen verwendet; durch Vergleich der

20 Sequenzen der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle mit solchen, die ähnliche Enzyme aus anderen Organismen codieren, kann der Evolutions-Verwandschaftsgrad der Organismen bestimmt werden. Entsprechend ermöglicht ein solcher Vergleich die Bestimmung,

25 welche Sequenzbereiche konserviert sind und welche nicht, was bei der Bestimmung solcher Bereiche des Proteins hilfreich sein kann, die für die Enzymfunktion essentiell sind. Dieser Typ der Bestimmung ist für Proteintechnologie-Untersuchungen wertvoll und kann einen Hinweis darauf geben, welches Protein Mutagenese

30 tolerieren kann, ohne die Funktion zu verlieren.

Die Manipulation der erfindungsgemäßen MCT-Nukleinsäuremoleküle kann die Produktion von MCT-Proteinen mit funktionellen Unterschieden zu den Wildtyp-MCT-Proteinen bewirken. Diese Proteine

35 können hinsichtlich ihrer Effizienz oder Aktivität verbessert werden, können in größerer Anzahl als gewöhnlich in der Zelle zugegen sein, oder können hinsichtlich ihrer Effizienz oder Aktivität geschwächt sein.

40 Es gibt viele Mechanismen, durch die die Veränderung eine erfindungsgemäßen MCT-Moleküls die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion einer oder mehrerer Feinchemikalien von einem *C. glutamicum*-Stamm, der ein solches verändertes Protein enthält, direkt beeinflusst. Die Gewinnung der Feinchemikalienverbindungen aus großangelegten *C. glutamicum*-Kulturen ist signifikant

45 verbessert, wenn *C. glutamicum* die gewünschten Verbindungen sezerniert, da diese Verbindungen leicht aus dem Kulturmedium

48

- gereinigt werden können (im Gegensatz zur Extraktion aus der Masse von *C. glutamicum*-Zellen). Durch Vergrößern der Anzahl oder Aktivität von Transportermolekülen, die die Feinchemikalien aus der Zelle exportieren, kann es möglich sein, die Menge der produzierten Feinchemikalie, die im extrazellulären Medium zugegen ist, zu steigern, wodurch die Ernte und Reinigung erleichtert wird. Zur effizienten Überproduktion von einer oder mehreren Feinchemikalien sind dagegen erhöhte Mengen von Cofaktoren, Vorstufenmolekülen und Zwischenverbindungen für die geeigneten Biosynthesewege erforderlich. Durch Vergrößern der Anzahl und/oder der Aktivität von Transporterproteinen, die am Import von Nährstoffen, wie Kohlenstoffquellen (d.h. Zuckern), Stickstoffquellen (d.h. Aminosäuren, Ammoniumsalzen), Phosphaten und Schwefel beteiligt sind, kann man die Produktion einer Feinchemikalie aufgrund der Entfernung von jeglichen Einschränkungen des Nährstoffangebots bei dem Biosyntheseprozess verbessern. Zudem sind Fettsäuren und Lipide selbst wünschenswerte Feinchemikalien; durch Optimieren der Aktivität oder durch Vergrößern der Anzahl von einem oder mehreren erfindungsgemäßen MCT-Proteinen, die an der Biosynthese dieser Verbindungen beteiligt sind, oder durch Beeinflussen der Aktivität von einem oder mehreren MCT-Proteinen, die am Abbau dieser Verbindungen beteiligt sind, kann man die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion von Fettsäure- und Lipidmoleküle von *C. glutamicum* steigern.
- Die genetische Manipulation von einem oder mehreren erfindungsgemäßen MCT-Genen kann ebenfalls MCT-Proteine mit veränderten Aktivitäten hervorbringen, die die Produktion von einer oder mehreren gewünschten Feinchemikalien aus *C. glutamicum* indirekt beeinflussen. Die normalen biochemischen Stoffwechselprozesse bewirken bspw. die Produktion einer Vielzahl von Abfallprodukten (z.B. Wasserstoffperoxid und andere reaktive Sauerstoffspezies) die mit den gleichen Stoffwechselprozessen aktiv wechselwirken können (bspw. nitriert Peroxynitrit bekanntlich Tyrosin-Seitenketten, wodurch einige Enzyme mit Tyrosin im aktiven Zentrum inaktiviert werden (Groves, J.T. (1999) Curr. Opin. Chem. Biol. 3(2); 226-235). Diese Abfallprodukte werden zwar üblicherweise ausgeschieden, die zur fermentativen Großproduktion verwendeten *C. glutamicum*-Stämme werden zur Überproduktion von einer oder mehreren Feinchemikalien jedoch optimiert und können so mehr Abfallprodukte produzieren als für einen *C. glutamicum*-Wildtyp üblich ist. Durch Optimieren der Aktivität von einem oder mehreren erfindungsgemäßen MCT-Proteinen, die am Export von Abfallmolekülen beteiligt sind, kann man die Lebensfähigkeit der Zelle verbessern und eine effiziente metabolische Aktivität beibehalten. Das Vorliegen hoher intrazellulärer Mengen der gewünschten Feinchemikalie kann für die Zelle toxisch sein, so kann man durch Steigern

49

der Fähigkeit der Zelle zur Sekretion dieser Verbindungen die Lebensfähigkeit der Zelle verbessern.

- Die erfindungsgemäßen MCT-Proteine können manipuliert werden, so
- 5 daß die relativen Mengen verschiedener Lipid- und Fettsäuremoleküle verändert werden. Dies kann eine erhebliche Auswirkung auf die Lipidzusammensetzung der Zellmembran haben. Da jeder Lipidtyp unterschiedliche physikalische Eigenschaften hat, kann eine Veränderung der Lipidzusammensetzung einer Membran die Membranfluidität
- 10 dität signifikant verändern. Änderungen der Membranfluidität können den Transport von Molekülen über die Membran beeinflussen, was wie vorstehend erläutert den Export von Abfallprodukten oder der produzierten Feinchemikalie oder den Import von notwendigen Nährstoffen modifizieren kann. Diese Membranfluiditätsänderungen
- 15 können ebenfalls die Zellintegrität erheblich beeinflussen; Zellen mit relativ schwächeren Membranen sind in einer Groß-Fermenterumgebung anfälliger gegenüber mechanischem Streß, was die Zellen beschädigen oder abtöten kann. Durch Manipulieren von MCT-Proteinen, die an der Produktion von Fettsäuren und Lipiden für
- 20 den Membranaufbau beteiligt sind, so daß die Membranzusammensetzung der resultierenden Membran gegenüber den in den Kulturen, die zur Produktion von Feinchemikalien verwendet werden, herrschenden Umweltbedingungen empfänglicher sind, sollten ein größerer Anteil an *C. glutamicum*-Zellen überleben und sich vermehren.
- 25 Größere Mengen an *C. glutamicum*-Zellen in einer Kultur sollten größere Ausbeuten, Produktion oder Effizienz der Produktion der Feinchemikalie aus der Kultur ergeben.

- Die vorstehend genannten Mutagenesestrategien für MCT-Proteine,
- 30 die erhöhte Ausbeuten einer Feinchemikalie aus *C. glutamicum* bewirken sollen, sollen nicht einschränkend sein; Variationen dieser Strategien sind dem Fachmann leicht ersichtlich. Durch diese Mechanismen und mit Hilfe der hier offenbarten Mechanismen können die erfindungsgemäßen Nukleinsäure- und Proteinmoleküle verwendet
- 35 werden, um *C. glutamicum* oder verwandte Bakterienstämme, die mutierte MCT-Nukleinsäure- und Proteinmoleküle exprimieren, zu erzeugen, so daß die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion einer gewünschten Verbindung verbessert wird. Die gewünschte Verbindung kann ein natürliches Produkt von *C. glutamicum* sein, welches die Endprodukte der Biosynthesewege und
- 40 Zwischenprodukte natürlich vorkommender metabolischer Wege sowie Moleküle umfaßt, die im Metabolismus von *C. glutamicum* nicht natürlich vorkommen, die jedoch von einem erfindungsgemäßen *C. glutamicum*-Stamm produziert werden.

50

Diese Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele weiter veranschaulicht, die nicht als einschränkend aufgefaßt werden sollen. Die Inhalte sämtlicher, in dieser Patentanmeldung zitierter Literaturstellen, Patentanmeldungen, Patente und veröffentlichter Patentanmeldungen sind hiermit durch Bezugnahme aufgenommen.

Beispiele

10 Beispiel 1: Präparation der gesamten genomischen DNA aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032

Eine Kultur von *Corynebacterium glutamicum* (ATCC 13032) wurde über Nacht bei 30°C unter starkem Schütteln in BHI-Medium (Difco) 15 gezüchtet. Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet, der Überstand wurde verworfen, und die Zellen wurden in 5ml Puffer I (5% des Ursprungsvolumens der Kultur - sämtliche angegebenen Volumina sind für 100 ml Kulturvolumen berechnet) resuspendiert. Die Zusammensetzung von Puffer I: 140,34 g/l Saccharose, 2,46 g/l 20 $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 10 ml/l KH_2PO_4 -Lösung (100g/l, mit KOH eingestellt auf pH-Wert 6,7), 50 ml/l M12-Konzentrat (10 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g/l NaCl, 2 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,2 g/l CaCl_2 , 0,5 g/l Hefe-Extrakt (Difco), 10 ml/l Spurenelemente-Mischung (200 mg/l $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 10 mg/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 3 mg/l $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, 30 mg/l H_3BO_3 , 20 mg/l 25 $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 1 mg/l $\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 3 mg/l $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 500 mg/l Komplexbildner (EDTA oder Citronensäure), 100 ml/l Vitamingemisch (0,2 ml/l Biotin, 0,2 mg/l Folsäure, 20 mg/l p-Aminobenzoessäure, 20 mg/l Riboflavin, 40 mg/l Ca-Panthothenat, 140 mg/l Nikotinsäure, 40 mg/l Pyridoxolhydrochlorid, 200 mg/l Myoinositol).

30 Lysozym wurde in einer Endkonzentration von 2,5 mg/ml zur Suspension gegeben. Nach etwa 4 Std. Inkubation bei 37°C wurde die Zellwand abgebaut, und die erhaltenen Protoplasten wurden durch Zentrifugation geerntet. Das Pellet wurde einmal mit 5 ml Puffer I und einmal mit 5 ml TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH-Wert 35 8) gewaschen. Das Pellet wurde in 4 ml TE-Puffer resuspendiert, und 0,5 ml SDS-Lösung (10%) und 0,5 ml NaCl-Lösung (5 M) wurden zugegeben. Nach Zugabe von Proteinase K in einer Endkonzentration von 200 µg/ml wurde die Suspension etwa 18 Std. bei 37°C inkubiert. Die DNA wurde durch Extraktion mit Phenol, Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol und Chloroform-Isoamylalkohol mittels Standard-Verfahren gereinigt. Dann wurde die DNA durch Zugabe von 1/50 Volumen 3 M Natriumacetat und 2 Volumina Ethanol, anschließender Inkubation für 30 min bei -20°C und 30 min Zentrifugation bei 12000 U/min in einer Hochgeschwindigkeitszentrifuge mit einem 40 SS34-Rotor (Sorvall) gefällt. Die DNA wurde in 1 ml TE-Puffer gelöst, der 20 µg/ml RNase A enthielt, und für mindestens 3 Std. bei 4°C gegen 1000 ml TE-Puffer dialysiert. Während dieser Zeit

51

wurde der Puffer 3mal ausgetauscht. Zu Aliquots von 0,4 ml der dialysierten DNA-Lösung wurden 0,4 ml 2 M LiCl und 0,8 ml Ethanol zugegeben. Nach 30 min Inkubation bei -20°C wurde die DNA durch Zentrifugation gesammelt (13000 U/min, Biofuge Fresco, Heraeus, Hanau, Deutschland). Das DNA-Pellet wurde in TE-Puffer gelöst. Durch dieses Verfahren hergestellte DNA konnte für alle Zwecke verwendet werden, einschließlich Southern-Blotting oder zur Konstruktion genomischer Banken.

10 Beispiel 2: Konstruktion genomischer *Corynebacterium glutamicum* (ATCC13032)-Banken in *Escherichia coli*

Ausgehend von DNA, hergestellt wie in Beispiel 1 beschrieben, wurden gemäß bekannter und gut eingeführter Verfahren (siehe

15 bspw. Sambrook, J. et al. (1989) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual". Cold Spring Harbor Laboratory Press oder Ausubel, F.M. et al. (1994) "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons) Cosmid- und Plasmid-Banken hergestellt.

20 Es ließ sich jedes Plasmid oder Cosmid einsetzen. Besondere Verwendung fanden die Plasmide pBR322 (Sutcliffe, J.G. (1979) Proc. Natl Acad. Sci. USA, 75: 3737-3741); pACYC177 (Change & Cohen (1978) J. Bacteriol. 134: 1141-1156); Plasmide der pBS-Reihe (pBSSK+, pBSSK- und andere; Stratagene, LaJolla, USA) oder
25 Cosmide, wie SuperCos1 (Stratagene, LaJolla, USA) oder Lorist6 (Gibson, T.J. Rosenthal, A., und Waterson, R.H. (1987) Gene 53: 283-286.

Beispiel 3: DNA-Sequenzierung und Computer-Funktionsanalyse

30

Genomische Banken, wie in Beispiel 2 beschrieben, wurden zur DNA-Sequenzierung gemäß Standard-Verfahren, insbesondere dem Kettenabbruchverfahren mit ABI377-Sequenziermaschinen (s. z.B. Fleischman, R.D. et al. (1995) "Whole-genome Random Sequencing and

35 Assembly of Haemophilus Influenzae Rd., Science 269; 496-512) verwendet. Die Sequenzierprimer mit den folgenden Nukleotidsequenzen wurden verwendet: 5'-GGAAACAGTATGACCATG-3' oder 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'.

40 Beispiel 4: In-vivo-Mutagenese

In vivo-Mutagenese von *Corynebacterium glutamicum* kann durchgeführt werden, indem eine Plasmid- (oder andere Vektor-) DNA durch *E. coli* oder andere Mikroorganismen (z.B. *Bacillus* spp.

45 oder Hefen, wie *Saccharomyces cerevisiae*) geleitet wird, die die Integrität ihrer genetischen Information nicht aufrechterhalten können. Übliche Mutatorstämme weisen Mutationen in den Genen für

52

das DNA-Reparatursystem auf (z.B., mutHLS, mutD, mutT, usw., zum Vergleich siehe Rupp, W.D. (1996) DNA repair mechanisms in *Escherichia coli* and *Salmonella*, S. 2277-2294, ASM: Washington). Diese Stämme sind dem Fachmann bekannt. Die Verwendung dieser Stämme ist bspw. in Greener, A. und Callahan, M. (1994) Strategies 7; 32-34 veranschaulicht.

Beispiel 5: DNA-Transfer zwischen *Escherichia coli* und *Corynebacterium glutamicum*

10

Mehrere *Corynebacterium*- und *Brevibacterium*-Arten enthalten endogene Plasmide (wie bspw. pHM1519 oder pBL1) die autonom replizieren (für einen Überblick siehe bspw. Martin, J.F. et al. (1987) Biotechnology 5: 137-146). Shuttle-Vektoren für *Escherichia coli* und *Corynebacterium glutamicum* lassen sich leicht mittels Standard-Vektoren für *E. coli* konstruieren (Sambrook, J. et al., (1989), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press oder Ausubel, F.M. et al. (1994) "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons), denen ein Replikationsursprung für und ein geeigneter Marker aus *Corynebacterium glutamicum* beigegeben wird. Solche Replikationsursprünge werden vorzugsweise von endogenen Plasmiden entnommen, die aus *Corynebacterium*- und *Brevibacterium*-Arten isoliert worden sind. Besondere Verwendung als Transformationsmarker für diese Arten sind Gene für Kanamycin-Resistenz (wie solche, die vom Tn5- oder Tn-903-Transposon stammen) oder für Chloramphenicol (Winnacker, E.L. (1987) "From Genes to Clones - Introduction to Gene Technology, VCH, Weinheim). Es gibt zahlreiche Beispiele in der Literatur zur Herstellung einer großen Vielzahl von Shuttle-Vektoren, die in *E. coli* und *C. glutamicum* repliziert werden, und die für verschiedene Zwecke verwendet werden können, einschließlich Gen-Überexpression (siehe bspw. Yoshihama, M. et al. (1985) J. Bacteriol. 162: 591-597, Martin, J.F. et al., (1987) Biotechnology, 5: 137-146 und Eikmanns, B.J. et al. (1992) Gene 102: 93-98).

Mittels Standard-Verfahren ist es möglich, ein Gen von Interesse in einen der vorstehend beschriebenen Shuttle-Vektoren zu klonieren und solche Hybrid-Vektoren in *Corynebacterium glutamicum*-Stämme einzubringen. Die Transformation von *C. glutamicum* läßt sich durch Protoplastentransformation (Kastsumata, R. et al., (1984) J. Bacteriol. 159, 306-311), Elektroporation (Liebl, E. et al., (1989) FEMS Microbiol. Letters, 53: 399-303) und in Fällen, bei denen spezielle Vektoren verwendet werden, auch durch Konjugation erzielen (wie z.B. beschrieben in Schäfer, A., et (1990) J. Bacteriol. 172: 1663-1666). Es ist ebenfalls möglich, die Shuttle-Vektoren für *C. glutamicum* auf *E. coli* zu übertragen,

53

indem Plasmid-DNA aus *C. glutamicum* (mittels im Fachgebiet bekannter Standard-Verfahren) präpariert wird und in *E. coli* transformiert wird. Dieser Transformationsschritt kann mit Standard-Verfahren erfolgen, jedoch wird vorteilhafterweise ein

5 Mcr-defizienter *E. coli*-Stamm verwendet, wie NM522 (Gough & Murray (1983) J. Mol. Biol. 166: 1-19).

Beispiel 6: Bestimmung der Expression des mutierten Proteins

- 10 Die Beobachtungen der Aktivität eines mutierten Proteins in einer transformierten Wirtszelle beruhen auf der Tatsache, daß das mutierte Protein auf ähnliche Weise und in ähnlicher Menge expri-
- miert wird wie das Wildtyp-Protein. Ein geeignetes Verfahren zur Bestimmung der Transkriptionsmenge des mutierten Gens (ein Anzei-
- 15 chen für die mRNA-Menge, die für die Translation des Genprodukts verfügbar ist) ist die Durchführung eines Northern-Blots (s. bspw. Ausubel et al., (1988) Current Protocols in Molecular Bio-
- 20 logy, Wiley: New York), wobei ein Primer, der so ausgestaltet ist, daß er an das Gen von Interesse bindet, mit einer nachweisbaren (gewöhnlich radioaktiven oder chemilumineszierenden) Mar-
- kierung versehen wird, so daß - wenn die Gesamt-RNA einer Kultur des Organismus extrahiert, auf einem Gel aufgetrennt, auf eine stabile Matrix übertragen und mit dieser Sonde inkubiert wird -
- 25 die Bindung und die Quantität der Bindung der Sonde das Vorliegen und auch die Menge von mRNA für dieses Gen anzeigt. Diese Information ist ein Nachweis für das Ausmaß der Transkription des mutierten Gens. Gesamt-Zell-RNA läßt sich durch verschiedene Verfahren aus *Corynebacterium glutamicum* isolieren, die im Fach-
- gebiet bekannt sind, wie beschrieben in Bormann, E.R. et al.,
- 30 (1992) Mol. Microbiol. 6: 317-326.

- Zur Bestimmung des Vorliegens oder der relativen Menge von Protein, das aus dieser mRNA translatiert wird, können Standard-Techniken, wie Western-Blot, eingesetzt werden (s. bspw. Ausubel
- 35 et al. (1988) "Current Protocols in Molecular Biology", Wiley, New York). Bei diesem Verfahren werden Gesamt-Zellproteine extrahiert, durch Gelelektrophorese getrennt, auf eine Matrix, wie Nitrocellulose, übertragen und mit einer Sonde, wie einem Anti-
- körper, inkubiert, die an das gewünschte Protein spezifisch bindet. Diese Sonde ist gewöhnlich mit einer chemilumineszierenden
- 40 oder kolorimetrischen Markierung versehen, die sich leicht nachweisen läßt. Das Vorliegen und die beobachtete Menge an Markierung zeigt das Vorliegen und die Menge des gesuchten Mutantenproteins in der Zelle an.

54

Beispiel 7: Wachstum von genetisch verändertem *Corynebacterium glutamicum* - Medien und Anzuchtbedingungen

- Genetisch veränderte Corynebakterien werden in synthetischen oder natürlichen Wachstumsmedien gezüchtet. Eine Anzahl unterschiedlicher Wachstumsmedien für Corynebakterien sind bekannt und leicht erhältlich (Lieb et al. (1989) Appl. Microbiol. Biotechnol. 32: 205-210; von der Osten et al. (1998) Biotechnology Letters 11: 11-16; Patent DE 4 120 867; Liebl (1992) "The Genus *Corynebacterium*", in: The Procaryotes, Bd. II, Balows, A., et al., Hrsg. Springer-Verlag). Diese Medien bestehen aus einer oder mehreren Kohlenstoffquellen, Stickstoffquellen, anorganischen Salzen, Vitaminen und Spurenelementen. Bevorzugte Kohlenstoffquellen sind Zucker, wie Mono-, Di- oder Polysaccharide. Sehr gute Kohlenstoffquellen sind bspw. Glucose, Fructose, Mannose, Galactose, Ribose, Sorbose, Ribulose, Lactose, Maltose, Saccharose, Raffinose, Stärke oder Cellulose. Man kann Zucker auch über komplexe Verbindungen, wie Melassen, oder andere Nebenprodukte aus der Zucker-Raffinierung zu den Medien geben. Es kann auch vorteilhaft sein, Gemische verschiedener Kohlenstoffquellen zuzugeben. Andere mögliche Kohlenstoffquellen sind Alkohole und organische Säuren, wie Methanol, Ethanol, Essigsäure oder Milchsäure. Stickstoffquellen sind gewöhnlich organische oder anorganische Stickstoffverbindungen oder Materialien, die diese Verbindungen enthalten. Beispielhafte Stickstoffquellen umfassen Ammoniak-Gas oder Ammoniumsalze, wie NH_4Cl oder $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4OH , Nitrate, Harnstoff, Aminosäuren oder komplexe Stickstoffquellen, wie Maisquellwasser, Sojamehl, Sojaprotein, Hefeextrakte, Fleischextrakte und andere.
- Anorganische Salzverbindungen, die in den Medien enthalten sein können, umfassen die Chlorid-, Phosphor-, oder Sulfatsalze von Calcium, Magnesium, Natrium, Kobalt, Molybdän, Kalium, Mangan, Zink, Kupfer und Eisen. Chelatbildner können zum Medium gegeben werden, um die Metallionen in Lösung zu halten. Besonders geeignete Chelatbildner umfassen Dihydroxyphenole, wie Catechol oder Protocatechuat oder organische Säuren, wie Citronensäure. Die Medien enthalten üblicherweise auch andere Wachstumsfaktoren, wie Vitamine oder Wachstumsförderer, zu denen bspw. Biotin, Riboflavin, Thiamin, Folsäure, Nikotinsäure, Panthothenat und Pyridoxin gehören. Wachstumsfaktoren und Salze stammen häufig von komplexen Medienkomponenten, wie Hefeextrakt, Melassen, Maisquellwasser und dergleichen. Die genaue Zusammensetzung der Medienverbindungen hängt stark vom jeweiligen Experiment ab und wird für jeden Fall individuell entschieden. Information über die Medienoptimierung ist erhältlich aus dem Lehrbuch "Applied Microbiol. Physiology, A Practical Approach" (Hrsg. P.M. Rhodes, P.F. Stanbury, IRL Press

55

(1997) S. 53-73, ISBN 0 19 963577 3). Wachstumsmedien lassen sich auch von kommerziellen Anbietern beziehen, wie Standard 1 (Merck) oder BHI (Brain heart infusion, DIFCO) und dergleichen.

- 5 Sämtliche Medienkomponenten sind sterilisiert, entweder durch Hitze (20 min bei 1,5 bar und 121°C) oder durch Sterilfiltration. Die Komponenten können entweder zusammen oder nötigenfalls getrennt sterilisiert werden. Sämtliche Medienkomponenten können zu Beginn der Anzucht zugegeben sein oder wahlfrei kontinuierlich oder
- 10 chargenweise hinzugegeben werden.

- Die Anzuchtbedingungen werden für jedes Experiment gesondert definiert. Die Temperatur sollte zwischen 15°C und 45°C liegen und kann während des Experimentes konstant gehalten oder verändert
- 15 werden. Der pH-Wert des Mediums sollte im Bereich von 5 bis 8,5, vorzugsweise um 7,0 liegen, und kann durch Zugabe von Puffern zu den Medien aufrechterhalten werden. Ein beispielhafter Puffer für diesen Zweck ist ein Kaliumphosphatpuffer. Synthetische Puffer, wie MOPS, HEPES; ACES usw., können alternativ oder gleichzeitig
- 20 verwendet werden. Der Anzucht-pH-Wert läßt sich während der Anzucht auch durch Zugabe von NaOH oder NH₄OH konstant halten. Werden komplexe Medienkomponenten, wie Hefe-Extrakt verwendet, sinkt der Bedarf an zusätzlichen Puffern, da viele komplexe Verbindungen eine hohe Pufferkapazität aufweisen. Beim Einsatz eines
- 25 Fermenters für die Anzucht von Mikroorganismen kann der pH-Wert auch mit gasförmigem Ammoniak reguliert werden.

- Die Inkubationsdauer liegt gewöhnlich in einem Bereich von mehreren Stunden bis zu mehreren Tagen. Diese Zeit wird so ausgewählt,
- 30 daß sich die maximale Menge Produkt in der Brühe ansammelt. Die offenbarten Wachstumsexperimente können in einer Vielzahl von Behältern, wie Mikrotiterplatten, Glasröhrchen, Glaskolben oder Glas- oder Metallfermentern unterschiedlicher Größen durchgeführt werden. Zum Screening einer großen Anzahl von Klonen sollten die
- 35 Mikroorganismen in Mikrotiterplatten, Glasröhrchen oder Schüttelkolben entweder mit oder ohne Schikanen gezüchtet werden. Vorzugsweise werden 100-ml-Schüttelkolben verwendet, die mit 10% (bezogen auf das Volumen) des erforderlichen Wachstumsmediums gefüllt sind. Die Kolben sollten auf einem Kreiselschüttler
- 40 (Amplitude 25 mm) mit einer Geschwindigkeit im Bereich von 100-300 U/min geschüttelt werden. Verdampfungsverluste können durch Aufrechterhalten einer feuchten Atmosphäre verringert werden; alternativ sollte für die Verdampfungsverluste eine mathematische Korrektur durchgeführt werden.

56

- Werden genetisch modifizierte Klone untersucht, sollten auch ein unmodifizierter Kontrollklon oder ein Kontrollklon getestet werden, der das Basisplasmid ohne Insertion enthält. Das Medium wird auf eine OD₆₀₀ von 0,5 - 1,5 angeimpft, wobei Zellen verwendet werden, die auf Agarplatten gezüchtet wurden, wie CM-Platten (10 g/l Glucose, 2,5 g/l NaCl, 2 g/l Harnstoff, 10 g/l Polypepton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l Fleischextrakt, 22 g/l Agar pH-Wert 6,8 mit 2 M NaOH), die bei 30°C inkubiert worden sind. Das Animpfen der Medien erfolgt entweder durch Einbringen einer Kochsalzlösung von *C. glutamicum*-Zellen von CM-Platten oder durch Zugabe einer flüssigen Vorkultur dieses Bakteriums.

Beispiel 8: In-vitro-Analyse der Funktion mutierter Proteine

- Die Bestimmung der Aktivitäten und kinetischen Parameter von Enzymen ist im Fachgebiet gut bekannt. Experimente zur Bestimmung der Aktivität eines bestimmten veränderten Enzyms müssen an die spezifische Aktivität des Wildtypenzyms angepaßt werden, was innerhalb der Fähigkeiten des Fachmann liegt. Überblicke über Enzyme im Allgemeinen sowie spezifische Einzelheiten, die die Struktur, Kinetiken, Prinzipien, Verfahren, Anwendungen und Beispiele zur Bestimmung vieler Enzymaktivitäten betreffen, können bspw. in den nachstehenden Literaturstellen gefunden werden: Dixon, M., und Webb, E.C: (1979) Enzymes, Longmans, London; Fersht (1985) Enzyme Structure and Mechanism, Freeman, New York; Walsh (1979) Enzymatic Reaction Mechanisms. Freeman, San Francisco; Price, N.C., Stevens, L. (1982) Fundamentals of Enzymology. Oxford Univ. Press: Oxford; Boyer, P.D: Hrsg. (1983) The Enzymes, 3. Aufl. Academic Press, New York; Bisswanger, H. (1994) Enzymkinetik, 2. Aufl. VCH, Weinheim (ISBN 3527300325); Bergmeyer, H.U., Bergmeyer, J., Graßl, M. Hrsg. (1983-1986) Methods of Enzymatic Analysis, 3. Aufl. Bd. I-XII, Verlag Chemie: Weinheim; und Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry (1987) Bd. A9, "Enzymes", VCH, Weinheim, S. 352-363.
- Die Aktivität von Proteinen, die an DNA binden, kann durch viele gut eingeführte Verfahren gemessen werden, wie DNA-Banden-Shift-Assays (die auch als Gelretardations-Assays bezeichnet werden). Die Wirkung dieser Proteine auf die Expression anderer Moleküle kann mit Reportergenassays (wie beschrieben in Kolmar, H. et al., (1995) EMBO J. 14: 3895-3904 und den darin zitierten Literaturstellen) gemessen werden. Reportergen-Testsysteme sind wohlbekannt und für Anwendungen in pro- und eukaryotischen Zellen etabliert, wobei Enzyme, wie beta-Galactosidase, Grün-Fluoreszenz-Protein und mehrere andere verwendet werden.

57

Die Bestimmung der Aktivität von Membran-Transportproteinen kann gemäß den Techniken, wie beschrieben in Gennis, R.B. (1989) "Pores, Channels and Transporters", in Biomembranes, Molecular Structure and Function, Springer: Heidelberg, S. 85-137; 199-234; 5 und 270-322, erfolgen.

Beispiel 9: Analyse des Einflusses von mutiertem Protein auf die Produktion des gewünschten Produktes

- 10 Die Wirkung der genetischen Modifikation in *C. glutamicum* auf die Produktion einer gewünschten Verbindung (wie einer Aminosäure) kann bestimmt werden, indem die modifizierten Mikroorganismen unter geeigneten Bedingungen (wie solchen, die vorstehend beschrieben sind) gezüchtet werden und das Medium und/oder die zellulären
- 15 Komponenten auf die erhöhte Produktion des gewünschten Produktes (d.h. einer Aminosäure) untersucht wird. Solche Analysetechniken sind dem Fachmann wohlbekannt und umfassen Spektroskopie, Dünnschichtchromatographie, Färbeverfahren verschiedener Art, enzymatische und mikrobiologische Verfahren sowie analytische Chromato-
- 20 graphie, wie Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (s. bspw. Ullman, Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A2, S. 89-90 und S. 443-613, VCH: Weinheim (1985); Fallon, A., et al., (1987) "Applications of HPLC in Biochemistry" in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Bd. 17; Rehm et al. (1993)
- 25 Biotechnology, Bd. 3, Kapitel III: "Product recovery and purification", S. 469-714, VCH: Weinheim; Belter, P.A. et al. (1988) Bioseparations: downstream processing for Biotechnology, John Wiley and Sons; Kennedy, J.F. und Cabral, J.M.S. (1992) Recovery processes for biological Materials, John Wiley and Sons;
- 30 Shaeiwitz, J.A. und Henry, J.D. (1988) Biochemical Separations, in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. B3; Kapitel 11, S. 1-27, VCH: Weinheim; und Dechow, F.J. (1989) Separation and purification techniques in biotechnology, Noyes Publications).
- 35
- Zusätzlich zur Messung des Fermentationsendproduktes ist es ebenfalls möglich, andere Komponenten der Stoffwechselwege zu analysieren, die zur Produktion der gewünschten Verbindung verwendet werden, wie Zwischen- und Nebenprodukte, um die Gesamt-Produktivität des Organismus, die Ausbeute und/oder die Effizienz der
- 40 Produktion der Verbindung zu bestimmen. Die Analyseverfahren umfassen Messungen der Nährstoffmengen im Medium (bspw. Zucker, Kohlenwasserstoffe, Stickstoffquellen, Phosphat und andere Ionen), Messungen der Biomassezusammensetzung und des Wachstums,
- 45 Analyse der Produktion gewöhnlicher Metabolite aus Biosynthesewegen und Messungen von Gasen, die während der Fermentation erzeugt werden. Standardverfahren für diese Messungen sind in

58

Applied Microbial Physiology; A Practical Approach, P.M. Rhodes und P.F. Stanbury, Hrsg. IRL Press, S. 103-129; 131-163 und 165-192 (ISBN: 0199635773) und den darin angegebenen Literaturstellen beschrieben.

5

Beispiel 10: Reinigung des gewünschten Produktes aus *C. glutamicum*-Kultur

- Die Gewinnung des gewünschten Produktes aus *C. glutamicum*-Zellen
- 10 oder aus dem Überstand der vorstehend beschriebenen Kultur kann durch verschiedene, im Fachgebiet bekannte Verfahren erfolgen. Wird das gewünschte Produkt von den Zellen nicht sezerniert, können die Zellen aus der Kultur durch langsame Zentrifugation geerntet werden, die Zellen können durch Standard-Techniken, wie
- 15 mechanische Kraft oder Ultraschall, lysiert werden. Die Zelltrümmer werden durch Zentrifugation entfernt, und die Überstandsfraktion, die die löslichen Proteine enthält, wird zur weiteren Reinigung der gewünschten Verbindung erhalten. Wird das Produkt von den *C. glutamicum*-Zellen sezerniert, werden die
- 20 Zellen durch langsame Zentrifugation aus der Kultur entfernt, und die Überstandsfraktion wird zur weiteren Reinigung behalten.

- Die Überstandsfraktion aus beiden Reinigungsverfahren wird einer Chromatographie mit einem geeigneten Harz unterworfen, wobei das
- 25 gewünschte Molekül entweder auf dem Chromatographieharz zurückgehalten wird, viele Verunreinigungen in der Probe jedoch nicht, oder wobei die Verunreinigungen auf dem Harz zurückbleiben, die Probe hingegen nicht. Diese Chromatographieschritte können nötigenfalls wiederholt werden, wobei die gleichen oder andere
- 30 Chromatographieharze verwendet werden. Der Fachmann ist in der Auswahl der geeigneten Chromatographieharze und der wirksamsten Anwendung für ein bestimmtes, zu reinigendes Molekül bewandert. Das gereinigte Produkt kann durch Filtration oder Ultrafiltration konzentriert und bei einer Temperatur aufbewahrt werden, bei der
- 35 die Stabilität des Produktes maximal ist.

- Im Fachgebiet sind viele Reinigungsverfahren bekannt, die nicht auf das vorhergehende Reinigungsverfahren eingeschränkt sind. Diese sind bspw. beschrieben in Bailey, J.E. & Ollis, D.F.
- 40 Biochemical Engineering Fundamentals, McGraw-Hill: New York (1986).

- Die Identität und Reinheit der isolierten Verbindungen kann durch Standard-Techniken des Fachgebiets bestimmt werden. Diese um-
- 45 fassen Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC), spektroskopische Verfahren, Färbeverfahren, Dünnschichtchromatographie, NIRS, Enzymtest oder mikrobiologische Tests. Diese Analysever-

59

- fahren sind zusammengefaßt in: Patek et al. (1994) Appl. Environ. Microbiol. 60: 133-140; Malakhova et al. (1996) Biotekhnologiya 11: 27-32; und Schmidt et al. (1998) Bioprocess Engineer. 19: 67-70. Ulmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry (1996) Bd. 5 A27, VCH: Weinheim, S. 89-90, S. 521-540, S. 540-547, S. 559-566, 575-581 und S. 581-587; Michal, G (1999) Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, John Wiley and Sons; Fallon, A. et al. (1987) Applications of HPLC in Biochemistry in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, 10 Bd. 17.

Äquivalente

- Der Fachmann erkennt oder kann - indem er lediglich Routine- 15 verfahren verwendet - viele Äquivalente der erfindungsgemäßen spezifischen Ausführungsformen feststellen. Diese Äquivalente sollen von den nachstehenden Patentansprüchen umfaßt sein.

20

25

30

35

40

45

60

Tabelle 1: Gene der Patentanmeldung
andere Transporter

	ID #	Contig	NT Start	NT Stop	Funktion des Gens
5	RXN01411	VV0050	26015	26779	SHIKIMAT TRANSPORTER
	RXN00449	VV0112	30992	32572	NATRIUM-Dicarboxylat Symport Protein
	RXN00960	VV0075	1139	105	PROTON/NATRIUM-GLUTAMAT SYMPORT PROTEIN
	RXN02447	VV0107	14297	13203	GALACTOS-PROTON SYMPORT
10	RXN02395	VV0176	16747	14858	GLYCIN BETAIN TRANSPORTER BETP
	RXN02348	VV0078	6027	7910	KUP SYSTEM KALIUM AUFNAHME PROTEIN
	RXN00297	VV0176	38630	39541	Hypothetischer Malonat Transporter
	RXN03103	VV0070	845	1087	GLUTAMAT-BINDENDER PROTEIN VORLÄUFER
15	RXN02993	VV0071	736	65	GLUTAMINE-BINDENDES PROTEIN
	RXN00201	VV0096	197	6	HOCH AFFINES RIBOSE TRANSPORT PROTEIN RBSD
	RXN00298	VV0176	40228	42072	HOCH AFFINES CHOLIN TRANSPORT PROTEIN
20	RXN00349	VV0135	35187	36653	Hypothetisches Trehalose Transport Protein
	RXN03097	VV0062	3	557	AMMONIUM TRANSPORT SYSTEM
	RXN03095	VV0057	4056	4424	CADMIUM EFFLUX SYSTEM HILFSPROTEIN HOMOLOGES
	RXN03160	VV0189	5150	5617	CHROMAT TRANSPORT PROTEIN
25	RXN02955	VV0176	8666	9187	DICARBOXYLAT TRANSPORTER
	RXN03109	VV0082	659	6	HEMIN TRANSPORT SYSTEM PERMEASE PROTEIN HMUU
	RXN02979	VV0149	2150	2383	QUECKSILBER TRANSPORT PROTEIN PERIPLASMISHE KOMPONENTE VORLÄUFER
30	RXN02987	VV0234	527	294	QUECKSILBER TRANSPORT PROTEIN PERIPLASMISHE KOMPONENTE VORLÄUFER
	RXN02929	VV0090	36837	37874	EISEN(III) DICITRAT TRANSPORT SYSTEM PERMEASE PROTEIN FECD
	RXN03079	VV0045	644	1660	EISEN(III) DICITRAT TRANSPORT SYSTEM PERMEASE PROTEIN FECD
35	RXN03084	VV0048	900	1817	EISEN(III) DICITRAT BINDENDES PERIPLASMATISCHES VORLÄUFERPROTEIN

40

45

Tabelle 2

GenBank™ Zugangs-Nr.	Gen-Name	Genfunktion	Literaturstellen
A09073	ppg	Phosphoenolpyruvatcarboxylase	Bachmann, B. et al. "DNA fragment coding for phosphoenolpyruvat carboxylase, recombinant DNA carrying said fragment, strains carrying the recombinant DNA and method for producing L-amino acids using said strains," Patent: EP 0358940-A 3 03/21/90
A45579, A45581, A45583, A45585 A45587		Threonindehydratase	Moeckel, B. et al. "Production of L-isoleucine by means of recombinant micro-organisms with deregulated threonine dehydratase," Patent: WO 9519442-A 5 07/20/95
AB003132	murC; flsQ; flsZ		Kobayashi, M. et al. "Cloning, sequencing, and characterization of the flsZ gene from coryneform bacteria," <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> , 236(2):383-388 (1997)
AB015023	murC; flsQ		Wachi, M. et al. "A murC gene from Coryneform bacteria," <i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> , 51(2):223-228 (1999)
AB018530	disR		Kimura, E. et al. "Molecular cloning of a novel gene, disR, which rescues the detergent sensitivity of a mutant derived from <i>Brevibacterium lactofermentum</i> ," <i>Biosci. Biotechnol. Biochem.</i> , 60(10):1565-1570 (1996)
AB018531	disR1; disR2		
AB020624	murI	D-Glutamatracemase	
AB023377	tkl	Transketolase	
AB024708	gltB; gltD	Glutamin-2-oxoglutarataminotransferase große und kleine Untereinheiten	
AB025424	acn	Aconitase	
AB027714	rep	Replikationsprotein	
AB027715	rep; aad	Replikationsprotein; Aminoglycosid- adenyltransferase	

GenBank™ Zugangs-Nr.	Gen-Name	Genfunktion	Literaturstellen
AF005242	argC	N-Acetylglutamat-5-semialdehyd- dehydrogenase	
AF005635	glnA	Glutaminsynthetase	
AF030405	hisF	Cyclase	
AF030520	argG	Argininosuccinatsynthetase	
AF031518	argF	Ornithincarbamolytransferase	
AF036932	aroD	3-Dehydroquinatedehydratase	
AF038548	pyc	Pyruvatcarboxylase	
AF038651	dcIAE; apt; rel	Dipeptid-bindendes Protein; Adenin- phosphoribosyltransferase; GTP- pyrophosphokinase	Wehmeier, L. et al. "The role of the Corynebacterium glutamicum rel gene in (p)ppGpp metabolism," <i>Microbiology</i> , 144:1853-1862 (1998)
AF041436	argR	Arginine-Repressor	
AF045998	impA	Inositolmonophosphatphosphatase	
AF048764	argH	Argininosuccinatlase	
AF049897	argC; argJ; argB; argD; argF; argR; argG; argH	N-Acetylglutamylphosphatereduktase; Ornithinacetyltransferase; N-Acetyl- glutamatkinase; Acetylmornithin- trans- aminase; Ornithin- carbamoyltransferase; Argininrepressor; Argininosuccinatsynthase; Argininosuccinatlase	
AF050109	inhA	Enoyl-acyl-Carrierprotein-Reductase	
AF050166	hisG	ATP-Phosphoribosyltransferase	
AF051846	hisA	Phosphoribosylformi- mino-5-amino-1-phosphoribosyl-4- imidazolecarboxamide isomerase	
AF052652	metA	Homoserin-O-acetyltransferase	Park, S. et al. "Isolation and analysis of metA, a methionine biosynthetic gene encoding homoserine acetyltransferase in Corynebacterium glutamicum," <i>Mol. Cells.</i> , 8(3):286-294 (1998)
AF053071	aroB	Dehydrochinatsynthetase	
AF060558	hisH	Glutaminamidotransferase	

GenBank™ Zugangs-Nr.	Gen-Name	Genfunktion	Literaturstellen
AF086704	hisE	Phosphoribosyl-ATP-pyrophospho- hydrolase	
AF114233	aroA	5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphatsynthase	
AF116184	panD	L-Aspartat-alpha-decarboxylase-Vorstufe	Dusch, N. et al. "Expression of the Corynebacterium glutamicum panD gene encoding L-aspartate-alpha-decarboxylase leads to pantothenate over-production in Escherichia coli," <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> , 65(4):1530-1539 (1999)
AF124518	aroD; aroE	3-Dehydrochinase; Shikimatdehydrogenase	
AF124600	aroC; aroK; aroB; pepQ	Chorismatsynthase; Shikimalkinase; 3-Dehydrochinatsynthase; mutmaßliche Cytoplasmapeptidase	
AF145897	inhA		
AF145898	inhA		
AJ001436	ectP	Transport von Ectoine, Glycin, Betain, Prolin	Peter, H. et al. "Corynebacterium glutamicum is equipped with four secondary carriers for compatible solutes: Identification, sequencing, and characterization of the proline/ectoine uptake system, ProP, and the ectoine/proline/glycine betaine carrier, EctP," <i>J. Bacteriol.</i> , 180(22):6005-6012 (1998)
AJ004934	dapD	Tetrahydroadipicolasuccinylase (unvollständig)	Wehrmann, A. et al. "Different modes of diaminopimelate synthesis and their role in cell wall integrity: A study with Corynebacterium glutamicum," <i>J. Bacteriol.</i> , 180(12):3159-3165 (1998)
AJ007732	ppc; secG; amt; ocd; soxA	Phosphoenolpyruvatcarboxylase; ?; High affinity-Ammonium-Aufnahmeprotein; mutmassliche Ornithin-cyclodecarboxylase; Sarcosinoxidase	
AJ010319	ftsY, glnB, glnD; srp; amtP	Beteiligt an Zellteilung; PII protein; uridylyltransferase (Uridylyl-entfernendes Enzym); Signalerkennungspartikel; Low affinity-Ammonium-Aufnahmeprotein	Jakoby, M. et al. "Nitrogen regulation in Corynebacterium glutamicum; Isolation of genes involved in biochemical characterization of corresponding proteins," <i>FEMS Microbiol.</i> , 173(2):303-310 (1999)
AJ132968	cat	Chloranphenicol-acetyltransferase	

GenBank™ Zugangs-Nr.	Gen-Name	Genfunktion	Literaturstellen
AJ224946	mqo	L-malate: Chinonoxido-reductase	Molenaar, D. et al. "Biochemical and genetic characterization of the membrane-associated malate dehydrogenase (acceptor) from <i>Corynebacterium glutamicum</i> ," <i>Eur. J. Biochem.</i> , 254(2):395-403 (1998)
AJ238250	ndh	NADH-dehydrogenase	Lichtinger, T. et al. "Biochemical and biophysical characterization of the cell wall porin of <i>Corynebacterium glutamicum</i> : The channel is formed by a low molecular mass polypeptide," <i>Biochemistry</i> , 37(43):15024-15032 (1998)
AJ238703	porA	Porin	Vertes, A.A. et al. "Isolation and characterization of IS31831, a transposable element from <i>Corynebacterium glutamicum</i> ," <i>Mol. Microbiol.</i> , 11(4):739-746 (1994)
D17429		Transposables Element IS31831	Usuda, Y. et al. "Molecular cloning of the <i>Corynebacterium glutamicum</i> (Brevibacterium lactofermentum AJ12036) <i>odhA</i> gene encoding a novel type of 2-oxoglutarate dehydrogenase," <i>Microbiology</i> , 142:3347-3354 (1996)
D84102	odhA	2-Oxoglutaratdehydrogenase	Katsumata, R. et al. "Production of L-threonine and L-isoleucine," Patent: JP 1987232392-A 1 10/12/87
E01358	hdh; hk	Homoserindehydrogenase; Homoserin-kinase	Katsumata, R. et al. "Production of L-threonine and L-isoleucine," Patent: JP 1987232392-A 2 10/12/87
E01359		Stromaufwärts des Startcodons des Homoserinkinase-Gens	
E01375		Tryptophan-Operon	
E01376	trpL; trpE	Leader-Peptid; Anthranilatsynthase	Matsui, K. et al. "Tryptophan operon, peptide and protein coded thereby, utilization of tryptophan operon gene expression and production of tryptophan," Patent: JP 1987244382-A 1 10/24/87
E01377		Promotor- und Operator-Bereiche des Tryptophan-Operons	Matsui, K. et al. "Tryptophan operon, peptide and protein coded thereby, utilization of tryptophan operon gene expression and production of tryptophan," Patent: JP 1987244382-A 1 10/24/87
E03937		Biotinsynthese	Hatakeyama, K. et al. "DNA fragment containing gene capable of coding biotin synthetase and its utilization," Patent: JP 1992278088-A 1 10/02/92
E04040		Diaminopelargonsäureaminotransferase	Kohama, K. et al. "Gene coding diaminopelargonic acid aminotransferase and desthiobiotin synthetase and its utilization," Patent: JP 1992330284-A 1 11/18/92

GenBank™ Zugangs-Nr.	Gen-Name	Genfunktion	Literaturstellen
E04041		Desthiobiotinsynthetase	Kohama, K. et al. "Gene coding diaminopelargonic acid aminotransferase and desthiobiotin synthetase and its utilization," Patent: JP 1992330284-A 1 11/18/92
E04307		Flavum aspartase	Kurusu, Y. et al. "Gene DNA coding aspartase and utilization thereof," Patent: JP 1993030977-A 1 02/09/93
E04376		Isocitratlyase	Katsumata, R. et al. "Gene manifestation controlling DNA," Patent: JP 1993056782-A 3 03/09/93
E04377		Isocitratlyase N-terminales Fragment	Katsumata, R. et al. "Gene manifestation controlling DNA," Patent: JP 1993056782-A 3 03/09/93
E04484		Prephenatdehydratase	Sotouchi, N. et al. "Production of L-phenylalanine by fermentation," Patent: JP 1993076352-A 2 03/30/93
E05108		Aspartokinase	Fugono, N. et al. "Gene DNA coding Aspartokinase and its use," Patent: JP 1993184366-A 1 07/27/93
E05112		Dihydro-dipichorinatsynthetase	Hatakeyama, K. et al. "Gene DNA coding dihydrodipicolinic acid synthetase and its use," Patent: JP 1993184371-A 1 07/27/93
E05776		Diaminopimelinsäuredehydrogenase	Kobayashi, M. et al. "Gene DNA coding Diaminopimelic acid dehydrogenase and its use," Patent: JP 1993284970-A 1 11/02/93
E05779		Threoninsynthase	Kohama, K. et al. "Gene DNA coding threonine synthase and its use," Patent: JP 1993284972-A 1 11/02/93
E06110		Prephenatdehydratase	Kikuchi, T. et al. "Production of L-phenylalanine by fermentation method," Patent: JP 1993344881-A 1 12/27/93
E06111		mutierte Prephenatdehydratase	Kikuchi, T. et al. "Production of L-phenylalanine by fermentation method," Patent: JP 1993344881-A 1 12/27/93
E06146		Acetohydroxysäuresynthetase	Inui, M. et al. "Gene capable of coding Acetohydroxy acid synthetase and its use," Patent: JP 1993344893-A 1 12/27/93
E06825		Aspartokinase	Suginoto, M. et al. "Mutant aspartokinase gene," patent: JP 1994062866-A 1 03/08/94
E06826		mutierte Aspartokinase alpha-Untereinheit	Suginoto, M. et al. "Mutant aspartokinase gene," patent: JP 1994062866-A 1 03/08/94

GenBank™ Zugangs-Nr.	Gen-Name	Genfunktion	Literaturstellen
E06827		mutierte Aspartokinase alpha-Untereinheit	Sugimoto, M. et al. "Mutant aspartokinase gene," patent: JP 1994062866-A 1 03/08/94
E07701	secY		Honno, N. et al. "Gene DNA participating in integration of membraneous protein to membrane," Patent: JP 1994169780-A 1 06/21/94
E08177		Aspartokinase	Sato, Y. et al. "Genetic DNA capable of coding Aspartokinase released from feedback inhibition and its utilization," Patent: JP 1994261766-A 1 09/20/94
E08178, E08179, E08180, E08181, E08182		Durch Rückkopplungshemmung freigesetzte Aspartokinase	Sato, Y. et al. "Genetic DNA capable of coding Aspartokinase released from feedback inhibition and its utilization," Patent: JP 1994261766-A 1 09/20/94
E08232		Acetohydroxysäureisomeroreduktase	Inui, M. et al. "Gene DNA coding acetohydroxy acid isomeroreductase," Patent: JP 1994277067-A 1 10/04/94
E08234	secE		Asai, Y. et al. "Gene DNA coding for translocation machinery of protein," Patent: JP 1994277073-A 1 10/04/94
E08643		FT-Aminotransferase und Desthiobiotin-synthetase-Promotorbereich	Hatakeyama, K. et al. "DNA fragment having promoter function in coryneform bacterium," Patent: JP 1995031476-A 1 02/03/95
E08646		Biotinsynthetase	Hatakeyama, K. et al. "DNA fragment having promoter function in coryneform bacterium," Patent: JP 1995031476-A 1 02/03/95
E08649		Aspartase	Kohama, K. et al. "DNA fragment having promoter function in coryneform bacterium," Patent: JP 1995031478-A 1 02/03/95
E08900		Dihydrodipicolinatoreduktase	Madori, M. et al. "DNA fragment containing gene coding Dihydrodipicolinate acid reductase and utilization thereof," Patent: JP 1995075578-A 1 03/20/95
E08901		Diaminopimelinsäuredecarboxylase	Madori, M. et al. "DNA fragment containing gene coding Diaminopimelic acid decarboxylase and utilization thereof," Patent: JP 1995075579-A 1 03/20/95
E12594		Serinhydroxymethyltransferase	Hatakeyama, K. et al. "Production of L-tryptophan," Patent: JP 1997028391-A 1 02/04/97
E12760, E12759, E12758		Transposase	Moriya, M. et al. "Amplification of gene using artificial transposon," Patent: JP 1997070291-A 03/18/97

GenBank™ Zugangs-Nr.	Gen-Name	Genfunktion	Literaturstellen
E12764		Arginyl-tRNA synthetase; Diaminopimelinsäuredecarboxylase	Moriya, M. et al. "Amplification of gene using artificial transposon," Patent: JP 1997070291-A 03/18/97
E12767		Dihydrodipicolinsäuresynthetase	Moriya, M. et al. "Amplification of gene using artificial transposon," Patent: JP 1997070291-A 03/18/97
E12770		Aspartokinase	Moriya, M. et al. "Amplification of gene using artificial transposon," Patent: JP 1997070291-A 03/18/97
E12773		Dihydrodipicolinsäurereductase	Moriya, M. et al. "Amplification of gene using artificial transposon," Patent: JP 1997070291-A 03/18/97
E13655		Glucose-6-phosphatedehydrogenase	Hatakeyama, K. et al. "Glucose-6-phosphate dehydrogenase and DNA capable of coding the same," Patent: JP 1997224661-A 1 09/02/97
L01508	IlvA	Threonindehydratase	Moeckel, B. et al. "Functional and structural analysis of the threonine dehydratase of Corynebacterium glutamicum," <i>J. Bacteriol.</i> , 174:8065-8072 (1992)
L07603	EC 4.2.1.15	3-Desoxy-D-arabinoheptulosonat-7-phosphatsynthase	Chen, C. et al. "The cloning and nucleotide sequence of Corynebacterium glutamicum 3-deoxy-D-arabinoheptulosonat-7-phosphate synthase gene," <i>FEBS Microbiol. Lett.</i> , 107:223-230 (1993)
L09232	IlvB; ilvN; ilvC	Acetohydroxysäuresynthase, große Untereinheit; Acetohydroxysäuresynthase kleine Untereinheit; Acetohydroxysäure-isomerase reductase	Keilhauer, C. et al. "Isoleucine synthesis in Corynebacterium glutamicum: molecular analysis of the ilvB-ilvN-ilvC operon," <i>J. Bacteriol.</i> , 175(17):5595-5603 (1993)
L18874	PtsM	Phosphoenolpyruvat-Zuckerphosphotransferase	Fouet, A. et al. "Bacillus subtilis sucrose-specific enzyme II of the phosphotransferase system: expression in Escherichia coli and homology to enzymes II from enteric bacteria," <i>PNAS USA</i> , 84(24):8773-8777 (1987); Lee, J.K. et al. "Nucleotide sequence of the gene encoding the Corynebacterium glutamicum mannose enzyme II and analyses of the deduced protein sequence," <i>FEMS Microbiol. Lett.</i> , 119(1-2):137-145 (1994)
L27123	aceB	Malatsynthase	Lee, H.-S. et al. "Molecular characterization of aceB, a gene encoding malate synthase in Corynebacterium glutamicum," <i>J. Microbiol. Biotechnol.</i> , 4(4):256-263 (1994)

GenBank™ Zugangs-Nr.	Gen-Name	Genfunktion	Literaturstellen
L27126		Pyruvatkinase	Jetten, M. S. et al. "Structural and functional analysis of pyruvate kinase from <i>Corynebacterium glutamicum</i> ," <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> , 60(7):2501-2507 (1994)
L28760	aceA	Isocitratlyase	
L35906	dtxR	Diphtherietoxinrepressor	Oguiza, J.A. et al. "Molecular cloning, DNA sequence analysis, and characterization of the <i>Corynebacterium diphtheriae</i> dtxR from <i>Brevibacterium lactofermentum</i> ," <i>J. Bacteriol.</i> , 177(2):465-467 (1995)
M13774		Prephenatdehydratase	Follettie, M.T. et al. "Molecular cloning and nucleotide sequence of the <i>Corynebacterium glutamicum</i> pheA gene," <i>J. Bacteriol.</i> , 167:695-702 (1986)
M16175	5S rRNA		Park, Y.-H. et al. "Phylogenetic analysis of the coryneform bacteria by 5S rRNA sequences," <i>J. Bacteriol.</i> , 169:1801-1806 (1987)
M16663	trpE	Anthranilat synthase, 5' -Ende	Sano, K. et al. "Structure and function of the trp operon control regions of <i>Brevibacterium lactofermentum</i> , a glutamic-acid-producing bacterium," <i>Gene</i> , 52:191-200 (1987)
M16664	trpA	Tryptophansynthase, 3' -Ende	Sano, K. et al. "Structure and function of the trp operon control regions of <i>Brevibacterium lactofermentum</i> , a glutamic-acid-producing bacterium," <i>Gene</i> , 52:191-200 (1987)
M25819		Phosphoenolpyruvatcarboxylase	O'Regan, M. et al. "Cloning and nucleotide sequence of the Phosphoenolpyruvate carboxylase-coding gene of <i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC13032," <i>Gene</i> , 77(2):237-251 (1989)
M85106		23S rRNA-Gen-Insertionssequenz	Roller, C. et al. "Gram-positive bacteria with a high DNA G+C content are characterized by a common insertion within their 23S rRNA genes," <i>J. Gen. Microbiol.</i> , 138:1167-1175 (1992)
M85107, M85108		23S rRNA-Gen-Insertionssequenz	Roller, C. et al. "Gram-positive bacteria with a high DNA G+C content are characterized by a common insertion within their 23S rRNA genes," <i>J. Gen. Microbiol.</i> , 138:1167-1175 (1992)

GenBank™ Zugangs-Nr.	Gen-Name	Genfunktion	Literaturstellen
M89931	accD; brnQ; yhbW	Beta C-S lyase; Verzweigketten-Aminosäure-Aufnahme-Carrier; hypothetisches Protein yhbW	Rossol, I. et al. "The Corynebacterium glutamicum accD gene encodes a C-S lyase with alpha, beta-elimination activity that degrades aminoethylcysteine," <i>J. Bacteriol.</i> , 174(9):2968-2977 (1992); Tauch, A. et al. "Isoleucine uptake in Corynebacterium glutamicum ATCC 13032 is directed by the brnQ gene product," <i>Arch. Microbiol.</i> , 169(4):303-312 (1998)
S59299	trp	Leader-Gen (Promotor)	Herry, D.M. et al. "Cloning of the trp gene cluster from a tryptophan-hyper-producing strain of Corynebacterium glutamicum: identification of a mutation in the trp leader sequence," <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> , 59(3):791-799 (1993)
U11545	trpD	Anthranylphosphoribosyltransferase	O'Gara, J.P. and Dunican, L.K. (1994) Complete nucleotide sequence of the Corynebacterium glutamicum ATCC 21850 tpD gene." Thesis, Microbiology Department, University College Galway, Ireland.
U13922	cglIM; cglIR; cglIIR	mutmaßliche Typ II 5-Cytosin-methyltransferase; mutmaßliche Typ II Restriktionsendonuklease; mutmaßliche Typ I- oder Typ III Restriktions-endo-nuklease	Schafer, A. et al. "Cloning and characterization of a DNA region encoding a stress-sensitive restriction system from Corynebacterium glutamicum ATCC 13032 and analysis of its role in intergeneric conjugation with Escherichia coli," <i>J. Bacteriol.</i> , 176(23):7309-7319 (1994); Schafer, A. et al. "The Corynebacterium glutamicum cglIM gene encoding a 5-cytosine in an McrBC-deficient Escherichia coli strain," <i>Gene</i> , 203(2):95-101 (1997)
U14965	recA		
U31224	ppx		Ankri, S. et al. "Mutations in the Corynebacterium glutamicum proline biosynthetic pathway: A natural bypass of the proA step," <i>J. Bacteriol.</i> , 178(15):4412-4419 (1996)
U31225	proC	L-Prolin: NADP+ 5-Oxidoreduktase	Ankri, S. et al. "Mutations in the Corynebacterium glutamicum proline biosynthetic pathway: A natural bypass of the proA step," <i>J. Bacteriol.</i> , 178(15):4412-4419 (1996)
U31230	obg; proB; unkdh	?; Gamma glutamylkinase; ähnlich den D-isomerspezifischen 2-Hydroxysäure-dehydrogenasen	Ankri, S. et al. "Mutations in the Corynebacterium glutamicum proline biosynthetic pathway: A natural bypass of the proA step," <i>J. Bacteriol.</i> , 178(15):4412-4419 (1996)
U31281	bioB	Bioinsynthese	Serebriskii, I.G., "Two new members of the bio B superfamily: Cloning, sequencing and expression of bio B genes of Methylobacillus flagellatum and Corynebacterium glutamicum," <i>Gene</i> , 175:15-22 (1996)

GenBank™ Zugangs-Nr.	Gen-Name	Genfunktion	Literaturstellen
U35023	thiR; accBC	Thiosulfat Schwefeltransferase; Acyl CoA-Carboxylase	Jager, W. et al. "A Corynebacterium glutamicum gene encoding a two-domain protein similar to biotin carboxylases and biotin-carboxyl-carrier proteins," <i>Arch. Microbiol.</i> , 166(2):76-82 (1996)
U43535	cmr	Multidrug-Resistenzprotein	Jager, W. et al. "A Corynebacterium glutamicum gene conferring multidrug resistance in the heterologous host <i>Escherichia coli</i> ," <i>J. Bacteriol.</i> , 179(7):2449-2451 (1997)
U43536	clpB	Hitzeschock-ATP-Bindungsprotein	
U53587	aphA-3	3'5"-Aminoglycosidphosphotransferase	
U89648		Nicht identifizierte Corynebacterium glutamicum-Sequenz, die an der Histidinbiosynthese beteiligt ist, partielle Sequenz	
X04960	trpA; trpB; trpC; trpD; trpE; trpG; trpL	Tryptophanoperon	Matsui, K. et al. "Complete nucleotide and deduced amino acid sequences of the <i>Brevibacterium lactofermentum</i> tryptophan operon," <i>Nucleic Acids Res.</i> , 14(24):10113-10114 (1986)
X07563	lys A	DAP-Decarboxylase (meso-diaminopimelatidecarboxylase, EC 4.1.1.20)	Yeh, P. et al. "Nucleic sequence of the lysA gene of <i>Corynebacterium glutamicum</i> and possible mechanisms for modulation of its expression," <i>Mol. Gen. Genet.</i> , 212(1):112-119 (1988)
X14234	EC 4.1.1.31	Phosphoenolpyruvatcarboxylase	Eikmanns, B.J. et al. "The Phosphoenolpyruvate carboxylase gene of <i>Corynebacterium glutamicum</i> : Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression," <i>Mol. Gen. Genet.</i> , 218(2):330-339 (1989); Lepiniec, L. et al. "Sorghum Phosphoenolpyruvate carboxylase gene family: structure, function and molecular evolution," <i>Plant. Mol. Biol.</i> , 21 (3):487-502 (1993)
X17313	fda	Fructose-bisphosphataldolase	Von der Osten, C.H. et al. "Molecular cloning, nucleotide sequence and fine-structural analysis of the <i>Corynebacterium glutamicum</i> fda gene: structural comparison of <i>C. glutamicum</i> fructose-1, 6-bisphosphate aldolase to class I and class II aldolases," <i>Mol. Microbiol.</i>
X53993	dapA	L-2, 3-Dihydrodipicolinatsynthetase (EC 4.2.1.52)	Bonnassie, S. et al. "Nucleic sequence of the dapA gene from <i>Corynebacterium glutamicum</i> ," <i>Nucleic Acids Res.</i> , 18(21):6421 (1990)

GenBank™ Zugangs-Nr.	Gen-Name	Genfunktion	Literaturstellen
X54223		AttB-verwandte Stelle	Cianciotto, N. et al. "DNA sequence homology between att B-related sites of Corynebacterium diphtheriae, Corynebacterium ulcerans, Corynebacterium glutamicum, and the attP site of lambdacorynephage," <i>FEMS. Microbiol. Lett.</i> , 66:299-302 (1990)
X54740	argS; lysA	Arginyl-tRNA-synthetase; Diaminopimelat-decarboxylase	Marcel, T. et al. "Nucleotide sequence and organization of the upstream region of the Corynebacterium glutamicum lysA gene," <i>Mol. Microbiol.</i> , 4(11):1819-1830 (1990)
X55994	trpL; trpE	mutmaßliches Leader-Peptid; Anthranilat-synthase-Komponente 1	Heery, D.M. et al. "Nucleotide sequence of the Corynebacterium glutamicum trpE gene," <i>Nucleic Acids Res.</i> , 18(23):7138 (1990)
X56037	thrC	Threoninsynthase	Han, K.S. et al. "The molecular structure of the Corynebacterium glutamicum threonine synthase gene," <i>Mol. Microbiol.</i> , 4(10):1693-1702 (1990)
X56075	attB-verwandte Stelle	Bindungsstelle	Cianciotto, N. et al. "DNA sequence homology between att B-related sites of Corynebacterium diphtheriae, Corynebacterium ulcerans, Corynebacterium glutamicum, and the attP site of lambdacorynephage," <i>FEMS. Microbiol. Lett.</i> , 66:299-302 (1990)
X57226	lysC-alpha; lysC-beta; asd	Aspartokinase-alpha-Untereinheit; Aspartokinase-beta-Untereinheit; Aspartat-beta-semialdehyddehydrogenase	Kalinowski, J. et al. "Genetic and biochemical analysis of the Aspartokinase from Corynebacterium glutamicum," <i>Mol. Microbiol.</i> , 5(5):1197-1204 (1991); Kalinowski, J. et al. "Aspartokinase genes lysC alpha and lysC beta overlap and are adjacent to the aspartate beta-semialdehyde dehydrogenase gene asd in Corynebacterium glutamicum," <i>Mol. Gen. Genet.</i> , 224(3):317-324 (1990)
X59403	gap;pgk; tpi	Glyceraldehyde-3-phosphat; Phosphoglyceratkinase; Triosephosphat-isomerase	Eikmanns, B.J. "Identification, sequence analysis, and expression of a Corynebacterium glutamicum gene cluster encoding the three glycolytic enzymes glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 3-phosphoglycerate kinase, and triosephosphate isomerase," <i>J. Bacteriol.</i> , 174(19):6076-6086 (1992)
X59404	gdh	Glutamatdehydrogenase	Bormann, E.R. et al. "Molecular analysis of the Corynebacterium glutamicum gdh gene encoding glutamate dehydrogenase," <i>Mol. Microbiol.</i> , 6(3):317-326 (1992)
X60312	lysI	L-Lysinpermease	Seep-Feldhaus, A.H. et al. "Molecular analysis of the Corynebacterium glutamicum lysI gene involved in lysine uptake," <i>Mol. Microbiol.</i> , 5(12):2995-3005 (1991)

GenBank™ Zugangs-Nr.	Gen-Name	Genfunktion	Literaturstellen
X66078	copI	PsI protein	Joliff, G. et al. "Cloning and nucleotide sequence of the cspI gene encoding PS1, one of the two major secreted proteins of <i>Corynebacterium glutamicum</i> : The deduced N-terminal region of PS1 is similar to the <i>Mycobacterium</i> antigen 85 complex," <i>Mol. Microbiol.</i> , 6(16):2349-2362 (1992)
X66112	glt	Citratsynthase	Eikmanns, B.J. et al. "Cloning sequence, expression and transcriptional analysis of the <i>Corynebacterium glutamicum</i> gltA gene encoding citrate synthase," <i>Microbiol.</i> , 140:1817-1828 (1994)
X67737	dapB	Dihydrodipicolinatreductase	
X69103	csp2	Oberflächenprotein PS2	Peyret, J.L. et al. "Characterization of the cspB gene encoding PS2, an ordered surface-layer protein in <i>Corynebacterium glutamicum</i> ," <i>Mol. Microbiol.</i> , 9(1):97-109 (1993)
X69104		IS3 -verwandtes Insertionselement	Bonamy, C. et al. "Identification of IS1206, a <i>Corynebacterium glutamicum</i> IS3-related insertion sequence and phylogenetic analysis," <i>Mol. Microbiol.</i> , 14(3):571-581 (1994)
X70959	leuA	Isopropylmalatsynthase	Patek, M. et al. "Leucine synthesis in <i>Corynebacterium glutamicum</i> : enzyme activities, structure of leuA, and effect of leuA inactivation on lysine synthesis," <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> , 60(1):133-140 (1994)
X71489	icd	Isocitratdehydrogenase (NADP+)	Eikmanns, B.J. et al. "Cloning sequence analysis, expression, and inactivation of the <i>Corynebacterium glutamicum</i> icd gene encoding isocitrate dehydrogenase and biochemical characterization of the enzyme," <i>J. Bacteriol.</i> , 177(3):774-782 (1995)
X72855	GdHA	Glutamatdehydrogenase (NADP+)	
X75083, X70584	mttA	5-Methyltryptophanresistenz	Heery, D.M. et al. "A sequence from a tryptophan-hyperproducing strain of <i>Corynebacterium glutamicum</i> encoding resistance to 5-methyltryptophan," <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> , 201(3):1255-1262 (1994)
X75085	recA		Fitzpatrick, R. et al. "Construction and characterization of recA mutant strains of <i>Corynebacterium glutamicum</i> and <i>Brevibacterium lactofermentum</i> ," <i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> , 42(4):575-580 (1994)

GenBank™ Zugangs-Nr.	Gen-Name	Genfunktion	Literaturstellen
X75504	aceA; thiX	partielle Isocitratlyase; ?	Reinscheid, D.J. et al. "Characterization of the isocitrate lyase gene from <i>Corynebacterium glutamicum</i> and biochemical analysis of the enzyme," <i>J. Bacteriol.</i> , 176(12):3474-3483 (1994)
X76875		ATPase beta-Untereinheit	Ludwig, W. et al. "Phylogenetic relationships of bacteria based on comparative sequence analysis of elongation factor Tu and ATP-synthase beta-subunit genes," <i>Antonie Van Leeuwenhoek</i> , 64:285-305 (1993)
X77034	tuf	Elongationsfaktor Tu	Ludwig, W. et al. "Phylogenetic relationships of bacteria based on comparative sequence analysis of elongation factor Tu and ATP-synthase beta-subunit genes," <i>Antonie Van Leeuwenhoek</i> , 64:285-305 (1993)
X77384	recA		Billman-Jacobe, H. "Nucleotide sequence of a recA gene from <i>Corynebacterium glutamicum</i> ," <i>DNA Seq.</i> , 4(6):403-404 (1994)
X78491	aceB	Malatsynthase	Reinscheid, D.J. et al. "Malate synthase from <i>Corynebacterium glutamicum</i> pla-ack operon encoding phosphotransacetylase: sequence analysis," <i>Microbiology</i> , 140:3099-3108 (1994)
X80629	16S rDNA	16S ribosomale RNA	Rainey, F.A. et al. "Phylogenetic analysis of the genera <i>Rhodococcus</i> and <i>Norcardia</i> and evidence for the evolutionary origin of the genus <i>Norcardia</i> from within the radiation of <i>Rhodococcus</i> species," <i>Microbiol.</i> , 141:523-528 (1995)
X81191	gluA; gluB; gluC; gluD	Glutamat-Aufnahmesystem	Kroneneyer, W. et al. "Structure of the gluABCD cluster encoding the glutamate uptake system of <i>Corynebacterium glutamicum</i> ," <i>J. Bacteriol.</i> , 177(5):1152-1158 (1995)
X81379	dapE	Succinylidiaminopimelaldehydesuccinylase	Wehrmann, A. et al. "Analysis of different DNA fragments of <i>Corynebacterium glutamicum</i> complementing dapE of <i>Escherichia coli</i> ," <i>Microbiology</i> , 40:3349-56 (1994)
X82061	16S rDNA	16S ribosomale RNA	Ruimy, R. et al. "Phylogeny of the genus <i>Corynebacterium</i> deduced from analyses of small-subunit ribosomal DNA sequences," <i>Int. J. Syst. Bacteriol.</i> , 45(4):740-746 (1995)
X82928	asd; lysC	Aspartatsemialdehyddehydrogenase; ?	Serebrijski, I. et al. "Multicopy suppression by asd gene and osmotic stress-dependent complementation by heterologous proA in proA mutants," <i>J. Bacteriol.</i> , 177(24):7255-7260 (1995)

GenBank™ Zugangs-Nr.	Gen-Name	Genfunktion	Literaturstellen
X82929	proA	Gamma-glutamylphosphatreduktase	Serebrijski, I. et al. "Multicopy suppression by asd gene and osmotic stress-dependent complementation by heterologous proA in proA mutants," <i>J. Bacteriol.</i> , 177(24):7255-7260 (1995)
X84257	16S rDNA	16S ribosomale RNA	Pascual, C. et al. "Phylogenetic analysis of the genus <i>Corynebacterium</i> based on 16S rRNA gene sequences," <i>Int. J. Syst. Bacteriol.</i> , 45(4):724-728 (1995)
X85965	aroP; dapE	aromatizierende Aminosäurepermease; ?	Wehrmann, A. et al. "Functional analysis of sequences adjacent to dapE of <i>Corynebacterium glutamicum</i> reveals the presence of aroP, which encodes the aromatic amino acid transporter," <i>J. Bacteriol.</i> , 177(20):5991-5993 (1995)
X86157	argB; argC; argD; argF; argJ	Acetylglutaminkinase; N-acetyl-gamma-glutamyl-phosphatreduktase; Acetylornithinaminotransferase; Ornithin-carbamoyltransferase; Glutamat-N-acetyltransferase	Sakanyan, V. et al. "Genes and enzymes of the acetyl cycle of arginine biosynthesis in <i>Corynebacterium glutamicum</i> : enzyme evolution in the early steps of the arginine pathway," <i>Microbiology</i> , 142:99-108 (1996)
X89084	pta; ackA	Phosphatase; Phosphatase; Acetatekinase	Reinscheid, D.J. et al. "Cloning, sequence analysis, expression and inactivation of the <i>Corynebacterium glutamicum</i> pta-ack operon encoding phosphotransacetylase and acetate kinase," <i>Microbiology</i> , 145:503-513 (1999)
X89850	attB	Bindungsstelle	Le Marrec, C. et al. "Genetic characterization of site-specific integration functions of phi AAU2 infecting <i>Arthrobacter aureus</i> C70," <i>J. Bacteriol.</i> , 178(7):1996-2004 (1996)
X90356		Promotorfragment F1	Patek, M. et al. "Promoters from <i>Corynebacterium glutamicum</i> : cloning, molecular analysis and search for a consensus motif," <i>Microbiology</i> , 142:1297-1309 (1996)
X90357		Promotorfragment F2	Patek, M. et al. "Promoters from <i>Corynebacterium glutamicum</i> : cloning, molecular analysis and search for a consensus motif," <i>Microbiology</i> , 142:1297-1309 (1996)
X90358		Promotorfragment F10	Patek, M. et al. "Promoters from <i>Corynebacterium glutamicum</i> : cloning, molecular analysis and search for a consensus motif," <i>Microbiology</i> , 142:1297-1309 (1996)

GenBank™ Zugangs-Nr.	Gen-Name	Genfunktion	Literaturstellen
X90359		Promotorfragment F13	Patek, M. et al. "Promoters from <i>Corynebacterium glutamicum</i> : cloning, molecular analysis and search for a consensus motif," <i>Microbiology</i> , 142:1297-1309 (1996)
X90360		Promotorfragment F22	Patek, M. et al. "Promoters from <i>Corynebacterium glutamicum</i> : cloning, molecular analysis and search for a consensus motif," <i>Microbiology</i> , 142:1297-1309 (1996)
X90361		Promotorfragment F34	Patek, M. et al. "Promoters from <i>Corynebacterium glutamicum</i> : cloning, molecular analysis and search for a consensus motif," <i>Microbiology</i> , 142:1297-1309 (1996)
X90362		Promotorfragment F37	Patek, M. et al. "Promoters from <i>Corynebacterium glutamicum</i> : cloning, molecular analysis and search for a consensus motif," <i>Microbiology</i> , 142:1297-1309 (1996)
X90363		Promotorfragment F45	Patek, M. et al. "Promoters from <i>Corynebacterium glutamicum</i> : cloning, molecular analysis and search for a consensus motif," <i>Microbiology</i> , 142:1297-1309 (1996)
X90364		Promotorfragment F64	Patek, M. et al. "Promoters from <i>Corynebacterium glutamicum</i> : cloning, molecular analysis and search for a consensus motif," <i>Microbiology</i> , 142:1297-1309 (1996)
X90365		Promotorfragment F75	Patek, M. et al. "Promoters from <i>Corynebacterium glutamicum</i> : cloning, molecular analysis and search for a consensus motif," <i>Microbiology</i> , 142:1297-1309 (1996)
X90366		Promotorfragment PF101	Patek, M. et al. "Promoters from <i>Corynebacterium glutamicum</i> : cloning, molecular analysis and search for a consensus motif," <i>Microbiology</i> , 142:1297-1309 (1996)
X90367		Promotorfragment PF104	Patek, M. et al. "Promoters from <i>Corynebacterium glutamicum</i> : cloning, molecular analysis and search for a consensus motif," <i>Microbiology</i> , 142:1297-1309 (1996)
X90368		Promotorfragment PF109	Patek, M. et al. "Promoters from <i>Corynebacterium glutamicum</i> : cloning, molecular analysis and search for a consensus motif," <i>Microbiology</i> , 142:1297-1309 (1996)

GenBank TM Zugangs-Nr.	Gen-Name	Genfunktion	Literaturstellen
X93513	amt	Ammonium-Transportsystem	Siewe, R.M. et al. "Functional and genetic characterization of the (methy) ammonium uptake carrier of <i>Corynebacterium glutamicum</i> ," <i>J. Biol. Chem.</i> , 271(10):5398-5403 (1996)
X93514	betP	Glycin-Betain-Transportsystem	Peter, H. et al. "Isolation, characterization, and expression of the <i>Corynebacterium glutamicum</i> betP gene, encoding the transport system for the compatible solute glycine betaine," <i>J. Bacteriol.</i> , 178(17):5229-5234 (1996)
X95649	orf4		Patek, M. et al. "Identification and transcriptional analysis of the dapB-ORF2-dapA-ORF4 operon of <i>Corynebacterium glutamicum</i> , encoding two enzymes involved in L-lysine synthesis," <i>Biotechnol. Lett.</i> , 19:1113-1117 (1997)
X96471	lysE; lysG	Lysinexportprotein; Lysinexportregulator-protein	Vrjic, M. et al. "A new type of transporter with a new type of cellular function: L-lysine export from <i>Corynebacterium glutamicum</i> ," <i>Mol. Microbiol.</i> , 22(5):815-826 (1996)
X96580	panB; panC; xylB	3-Methyl-2-oxobutanoatehydroxymethyl-transferase; Pantoat-beta-alaninligase; Xylulokinase	Sahn, H. et al. "D-pantothenate synthesis in <i>Corynebacterium glutamicum</i> and use of panBC and genes encoding L-valine synthesis for D-pantothenate overproduction," <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> , 65(5):1973-1979 (1999)
X96962		Insertionssequenz IS1207 und Transposase	
X99289		Elongationsfaktor P	Ramos, A. et al. "Cloning, sequencing and expression of the gene encoding elongation factor P in the amino-acid producer <i>Brevibacterium lactofermentum</i> (<i>Corynebacterium glutamicum</i> ATCC 13869)," <i>Gene</i> , 198:217-222 (1997)
Y00140	thrB	Homoserinkinase	Mateos, L.M. et al. "Nucleotide sequence of the homoserine kinase (thrB) gene of the <i>Brevibacterium lactofermentum</i> ," <i>Nucleic Acids Res.</i> , 15(9):3922 (1987)
Y00151	ddh	Meso-diaminopimelat-D-dehydrogenase (EC 1.4.1.16)	Ishino, S. et al. "Nucleotide sequence of the meso-diaminopimelat D-dehydrogenase gene from <i>Corynebacterium glutamicum</i> ," <i>Nucleic Acids Res.</i> , 15(9):3917 (1987)
Y00476	thrA	Homoserindehydrogenase	Mateos, L.M. et al. "Nucleotide sequence of the homoserine dehydrogenase (thrA) gene of the <i>Brevibacterium lactofermentum</i> ," <i>Nucleic Acids Res.</i> , 15(24):10598 (1987)

GenBank™ Zugangs-Nr.	Gen-Name	Genfunktion	Literaturstellen
Y00546	hom, thrB	Homoserindehydrogenase; Homoserin-kinase	Peoples, O.P. et al. "Nucleotide sequence and fine structural analysis of the Corynebacterium glutamicum hom-thrB operon," <i>Mol. Microbiol.</i> , 2(1):63-72 (1988)
Y08964	murC; fisQ/divD; fisZ	UPD-N-Acetylmuramalaninligase; Teilungsinitiationsprotein oder Zellteilungsprotein; Zellteilungsprotein	Honrubia, M.P. et al. "Identification, characterization, and chromosomal organization of the fisZ gene from Brevibacterium lactofermentum," <i>Mol. Gen. Genet.</i> , 259(1):97-104 (1998)
Y09163	putP	High affinity-Prolintransportsystem	Peter, H. et al. "Isolation of the putP gene of Corynebacterium glutamicum-proline and characterization of a low-affinity uptake system for compatible solutes," <i>Arch. Microbiol.</i> , 168(2):143-151 (1997)
Y09548	pyc	Pyruvatcarboxylase	Peters-Weidisch, P.G. et al. "Pyruvate carboxylase from Corynebacterium glutamicum: characterization, expression and inactivation of the pyc gene," <i>Microbiology</i> , 144:915-927 (1998)
Y09578	leuB	3-Isopropylmalatdehydrogenase	Patek, M. et al. "Analysis of the leuB gene from Corynebacterium glutamicum," <i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> , 50(1):42-47 (1998)
Y12472		Bindungsstelle Bacteriophage Phi-16	Moreau, S. et al. "Site-specific integration of corynephage Phi-16: The construction of an integration vector," <i>Microbiol.</i> , 145:539-548 (1999)
Y12537	proP	Prolin/Ectoin-Aufnahmesystemprotein	Peter, H. et al. "Corynebacterium glutamicum is equipped with four secondary carriers for compatible solutes: Identification, sequencing, and characterization of the proline/ectoine uptake system, ProP, and the ectoine/proline/glycine betaine carrier, EctP," <i>J. Bacteriol.</i> , 180(22):6005-6012 (1998)
Y13221	glnA	Glutaminsynthetase I	Jakoby, M. et al. "Isolation of Corynebacterium glutamicum glnA gene encoding glutamine synthetase I," <i>FEMS Microbiol. Lett.</i> , 154(1):81-88 (1997)
Y16642	lpd	Dihydroipoamiddehydrogenase	
Y18059		Bindungsstelle Corynephage 304L	Moreau, S. et al. "Analysis of the integration functions of φ304L: An integrase module among corynephages," <i>Virology</i> , 255(1):150-159 (1999)
Z21501	argS; lysA	Arginyl-tRNA-Synthetase; Diaminopimelatdecarboxylase (partiell)	Oguiza, J.A. et al. "A gene encoding arginyl-tRNA synthetase is located in the upstream region of the lysA gene in Brevibacterium lactofermentum: Regulation of argS-lysA cluster expression by arginine," <i>J. Bacteriol.</i> , 175(22):7356-7362 (1993)

GenBank™ Zugangs-Nr.	Gen-Name	Genfunktion	Literaturstellen
Z21502	dapA; dapB	Dihydrodipicolinatsynthase; Dihydrodipicolinatreduktase	Pisabarro, A. et al. "A cluster of three genes (dapA, orf2, and dapB) of Brevibacterium lactofermentum encodes dihydrodipicolinate reductase, and a third polypeptide of unknown function," <i>J. Bacteriol.</i> , 175(9):2743-2749 (1993)
Z29563	thrC	Threoninsynthase	Malumbres, M. et al. "Analysis and expression of the thrC gene of the encoded threonine synthase," <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> , 60(7):2209-2219 (1994)
Z46753	16S rDNA	Gene für 16S ribosomale RNA	
Z49822	sigA	SigA-Signalfaktor	Oguiza, J.A. et al. "Multiple sigma factor genes in Brevibacterium lactofermentum: Characterization of sigA and sigB," <i>J. Bacteriol.</i> , 178(2):550-553 (1996)
Z49823	galE; dtxR	Katalytische Aktivität UDP-Galactose 4-epimerase; Diphtherietoxin-regulatorisches Protein	Oguiza, J.A. et al. "The galE gene encoding the UDP-galactose 4-epimerase of Brevibacterium lactofermentum is coupled transcriptionally to the dndR gene," <i>Gene</i> , 177:103-107 (1996)
Z49824	orf1; sigB	?; SigB-Signalfaktor	Oguiza, J.A. et al. "Multiple sigma factor genes in Brevibacterium lactofermentum: Characterization of sigA and sigB," <i>J. Bacteriol.</i> , 178(2):550-553 (1996)
Z66534		Transposase	Correia, A. et al. "Cloning and characterization of an IS-like element present in the genome of Brevibacterium lactofermentum ATCC 13869," <i>Gene</i> , 170(1):91-94 (1996)

- 1) Eine Sequenz für dieses Gen wurde in den angegebenen Literaturstellen veröffentlicht. Die von den Erfindern der vorliegenden Erfindung erhaltene Sequenz ist jedoch erheblich länger als die veröffentlichte Version. Man nimmt an, daß die veröffentlichte Version auf einem inkorrekten Startcodon beruht und somit nur ein Fragment des tatsächlichen codierenden Bereichs darstellt.

TABELLE 3: Corynebacterium- und Brevibacterium-Stämme, die sich in der erfindungsgemäßen Praxis einsetzen lassen.

Gattung	Art	ATCC	FERM	NRRL	CECT	NCIMB	CBS	NCTC	DSMZ
Brevibacterium	aminoniagenes	21054							
Brevibacterium	aminoniagenes	19350							
Brevibacterium	aminoniagenes	19351							
Brevibacterium	aminoniagenes	19352							
Brevibacterium	aminoniagenes	19353							
Brevibacterium	aminoniagenes	19354							
Brevibacterium	aminoniagenes	19355							
Brevibacterium	aminoniagenes	19356							
Brevibacterium	aminoniagenes	21055							
Brevibacterium	aminoniagenes	21077							
Brevibacterium	aminoniagenes	21553							
Brevibacterium	aminoniagenes	21580							
Brevibacterium	aminoniagenes	39101							
Brevibacterium	butanicum	21196							
Brevibacterium	divaricatum	21792	P928						
Brevibacterium	flavum	21474							
Brevibacterium	flavum	21129							
Brevibacterium	flavum	21518							
Brevibacterium	flavum			B11474					
Brevibacterium	flavum			B11472					
Brevibacterium	flavum	21127							
Brevibacterium	flavum	21128							
Brevibacterium	flavum	21427							
Brevibacterium	flavum	21475							
Brevibacterium	flavum	21517							
Brevibacterium	flavum	21528							
Brevibacterium	flavum	21529							

Gattung	Art	ATCC	FERM	NRRL	CECT	NCIMB	CBS	NCTC	DSMZ
Brevibacterium	flavum			B11477					
Brevibacterium	flavum			B11478					
Brevibacterium	flavum	21127							
Brevibacterium	flavum			B11474					
Brevibacterium	healii	15527							
Brevibacterium	ketoglutamicum	21004							
Brevibacterium	ketoglutamicum	21089							
Brevibacterium	ketoreductum	21914							
Brevibacterium	lactofermentum				70				
Brevibacterium	lactofermentum				74				
Brevibacterium	lactofermentum				77				
Brevibacterium	lactofermentum	21798							
Brevibacterium	lactofermentum	21799							
Brevibacterium	lactofermentum	21800							
Brevibacterium	lactofermentum	21801							
Brevibacterium	lactofermentum			B11470					
Brevibacterium	lactofermentum			B11471					
Brevibacterium	lactofermentum	21086							
Brevibacterium	lactofermentum	21420							
Brevibacterium	lactofermentum	21086							
Brevibacterium	lactofermentum	31269							
Brevibacterium	linens	9174							
Brevibacterium	linens	19391							
Brevibacterium	linens	8377							
Brevibacterium	paraffinolyticum					11160			
Brevibacterium	spec.						717.73		
Brevibacterium	spec.						717.73		
Brevibacterium	spec.	14604							
Brevibacterium	spec.	21860							
Brevibacterium	spec.	21864							

Gattung	Art	ATCC	FERM	NRRL	CECT	NCIMB	CBS	NCTC	DSMZ
Brevibacterium	spec.	21865							
Brevibacterium	spec.	21866							
Brevibacterium	spec.	19240							
Corynebacterium	acetoacidophilum	21476							
Corynebacterium	acetoacidophilum	13870							
Corynebacterium	acetoglutamicum			B11473					
Corynebacterium	acetoglutamicum			B11475					
Corynebacterium	acetoglutamicum	15806							
Corynebacterium	acetoglutamicum	21491							
Corynebacterium	acetoglutamicum	31270							
Corynebacterium	acetophilum			B3671					
Corynebacterium	ammoniaenes	6872						2399	
Corynebacterium	ammoniaenes	15511							
Corynebacterium	fujikense	21496							
Corynebacterium	glutamicum	14067							
Corynebacterium	glutamicum	39137							
Corynebacterium	glutamicum	21254							
Corynebacterium	glutamicum	21255							
Corynebacterium	glutamicum	31830							
Corynebacterium	glutamicum	13032							
Corynebacterium	glutamicum	14305							
Corynebacterium	glutamicum	15455							
Corynebacterium	glutamicum	13058							
Corynebacterium	glutamicum	13059							
Corynebacterium	glutamicum	13060							
Corynebacterium	glutamicum	21492							
Corynebacterium	glutamicum	21513							
Corynebacterium	glutamicum	21526							
Corynebacterium	glutamicum	21543							
Corynebacterium	glutamicum	13287							

Gattung	Art	ATCC	FERM	NRRL	CECT	NCIMB	CBS	NCTC	DSMZ
Corynebacterium	glutamicum	21851							
Corynebacterium	glutamicum	21253							
Corynebacterium	glutamicum	21514							
Corynebacterium	glutamicum	21516							
Corynebacterium	glutamicum	21299							
Corynebacterium	glutamicum	21300							
Corynebacterium	glutamicum	39684							
Corynebacterium	glutamicum	21488							
Corynebacterium	glutamicum	21649							
Corynebacterium	glutamicum	21650							
Corynebacterium	glutamicum	19223							
Corynebacterium	glutamicum	13869							
Corynebacterium	glutamicum	21157							
Corynebacterium	glutamicum	21158							
Corynebacterium	glutamicum	21159							
Corynebacterium	glutamicum	21355							
Corynebacterium	glutamicum	31808							
Corynebacterium	glutamicum	21674							
Corynebacterium	glutamicum	21562							
Corynebacterium	glutamicum	21563							
Corynebacterium	glutamicum	21564							
Corynebacterium	glutamicum	21565							
Corynebacterium	glutamicum	21566							
Corynebacterium	glutamicum	21567							
Corynebacterium	glutamicum	21568							
Corynebacterium	glutamicum	21569							
Corynebacterium	glutamicum	21570							
Corynebacterium	glutamicum	21571							
Corynebacterium	glutamicum	21572							
Corynebacterium	glutamicum	21573							

Gattung	Art	ATCC	FERM	NRRL	CECT	NCIMB	CBS	NCTC	DSMZ
Corynebacterium	glutamicum	21579							
Corynebacterium	glutamicum	19049							
Corynebacterium	glutamicum	19050							
Corynebacterium	glutamicum	19051							
Corynebacterium	glutamicum	19052							
Corynebacterium	glutamicum	19053							
Corynebacterium	glutamicum	19054							
Corynebacterium	glutamicum	19055							
Corynebacterium	glutamicum	19056							
Corynebacterium	glutamicum	19057							
Corynebacterium	glutamicum	19058							
Corynebacterium	glutamicum	19059							
Corynebacterium	glutamicum	19060							
Corynebacterium	glutamicum	19185							
Corynebacterium	glutamicum	13286							
Corynebacterium	glutamicum	21515							
Corynebacterium	glutamicum	21527							
Corynebacterium	glutamicum	21544							
Corynebacterium	glutamicum	21492							
Corynebacterium	glutamicum			B8183					
Corynebacterium	glutamicum			B8182					
Corynebacterium	glutamicum			B12416					
Corynebacterium	glutamicum			B12417					
Corynebacterium	glutamicum			B12418					
Corynebacterium	glutamicum			B11476					
Corynebacterium	glutamicum	21608							
Corynebacterium	glutamicum		P973						
Corynebacterium	lilium								
Corynebacterium	nitrophilus	21419				11594			
Corynebacterium	spec.		P4445						
Corynebacterium	spec.		P4446						

Gattung	Art	ATCC	FERM	NRRL	CECT	NCIMB	CBS	NCTC	DSMZ
Corynebacterium	spec.	31088							
Corynebacterium	spec.	31089							
Corynebacterium	spec.	31090							
Corynebacterium	spec.	31090							
Corynebacterium	spec.	31090							
Corynebacterium	spec.	15954							20145
Corynebacterium	spec.	21857							
Corynebacterium	spec.	21862							
Corynebacterium	spec.	21863							

ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA
 FERM: Fermentation Research Institute, Chiba, Japan
 NRRL: ARS Culture Collection, Northern Regional Research Laboratory, Peoria, IL, USA
 CECT: Coleccion Espanola de Cultivos Tipo, Valencia, Spain
 NCIMB: National Collection of Industrial and Marine Bacteria Ltd., Aberdeen, UK
 CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, NL
 NCTC: National Collection of Type Cultures, London, UK
 DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany

Siehe Sugawara, H. et al. (1993) World directory of collections of cultures of microorganisms: Bacteria, fungi and yeasts (4. Aufl.), World federation for culture collections world data center on microorganisms, Saimata, Japan.

RXN03084 translatiert von RXN03084 (3960) von 1 bis 918

MSSRRKLSSALIVLLAAALPLTACSSSSEEEASTSSATREFTDAHGTTTEVPENPQRVVVLEPLELDTAIALGITPVGA AVANN
VTGIPAYLGVDGIEPVGTVSEPNIEAIAALEPDLILGTDSRHAIEIYDRLESIAPTVMTHVDPWKDNVVFIGDALGKKQESE
DLIQGFNDKCEEIKSEHDVEGKTVNMIRPRDEQTMSTLYGPTSFAGSSLECAGLTIPDQEWKDDLQADIAPENFMLATADYV FV
TATDVTDENELPEVIRENREQFPSLTLVDTSYWVSGVGLGSKVLEDIDAFLDAQQ

RXN03084 - 5'-Region

CCACCCCCACGTCTAAGTTTTCCCTATTACACACACCTGACCGAAGCTGTAAGGTTTGCCTAATCTTTTTCAATCTAAAGT
CAGGATATTCACAGCCC

RXN03084 - kodierende Region

ATGTCATCTCGCAGAAAACCTCTCCTCCGCACTGATCGTGCTTCTCGCAGCAGCACTACCTCTTACTGCTTGTTCTCCTCCAGCTC
AGAAGAGGAAGCATCCACCAGCTCTGCGACTCGCGAATTCACAGACGCTCACGGAACAACCGAAGTCCCGAAAATCCTCAGC
GCGTCGTTGTCCTCGAGCCACTTGAGCTAGACACCGCAATCGCCCTCGGAATCACCCAGTGGGTGCAGCTGTCGCCAACAAAC
GTCACTGGTATTCCTGCATATCTCGGCGTCGATGGAATCGAGCCTGTCTGGCACCGTTTCTGAGCCAAATATCGAAGCGATCGC
TGCTCTCGAGCCCGACCTGATCCTGGGCACCGATTCCCGCCACGCCGAAATCTACGACCGCCTCGAATCCATCGCCCCAACCG
TGTTTCATGACAACCCATGTTGATCCGTGGAAGACAATGTCGTCTTCATCGGCGATGCATTGGGCAAGAAGCAGGAATCCGAG
GATCTCATCCAAGGCTTTAATGACAAGTGCGAAGAGATCAAGTCCGAGCATGATGTCGAAGGTAAGACCGTCAACATGATTCTG
TCCCCGCGACGAGCAAACCATGAGCCTATACGGCCCCGACCTCATTTGCCGGCAGCTCTTTGGAGTGCGCAGGACTCACCATTCT
CTGATCAGGAATGGAAGGATGACCTCCAGGCCGACATCGCTCCTGAGAACTTCATGCTCGCCACCGCCGACTACGTCTTTGTC
ACCGCAACTGATGTCACCGATGAAAATGAGCTCCCCGAAGTAATCCGAGAAAACCGCGAACAGTTCCTCATCTACCCTTGT
ATACCAGCTACTGGGTATCTGGCGTCGGTCCACTTGCGGCAGCAAAGTCTTGGAAGACATCGATGCCTTCCTCGACGCAC
AGCAA

RXN03084 - 3'-Region

TAATGTCCACAGCTCTCCCGAT

RXN03079 translatiert von RXN03079 (7356) von 1 bis 1017

LSRTGVSKPKLTAPVVIIGTLVLLIIAFTASLMLGPVTVPLNELATNPVVTDIRAPRIIIAALVGAALAVSGAIMQTVFHNP
LADPGIVGVSSGAAVAVALAIVTGASFFGQWTVPFAAFVGALVTVAVVYLIASSRAMDGRGADPATLVLVGMAITAF LGAVIS
SATANAPQDSELRSVTFWLNGDLVSRTWEHVGVAIPIIIVGLILAIGGSRDLNLLLLGDSTAQTSGLNVNRARIILLALAALL
TATAVAVSGTITFVGLVPHLVRIVLGADHRALLPAAAILGATFVIVSDTVARMIFSPIVLQTVGVVAFIGSPIFLYLLLSMR
KRRGLGL

RXN03079 - 5'-Region

GAGCGGGTTGCTATCGGCCGAAAGTTTAGGGTTTTGTTCAATCTGTTGGTTAGTATTGCTTGGGTAAACAAGTCATAACAAT
TTTCATTAAGGGTCGTT

RXN03079 - kodierende Region

TTGTGCGGCACAGGTGTTTCGAAAAACCAAAGCTCACCGCTCCTGTTGTCATCATCGGCACCCCTCGTCTTGTTGATCATCGC
CTTCACCGCTTCCCTCATGCTGGGTCCCGTGACGGTTCCATTGAATGAGCTTGCAACCAACCCCGTTGTCACCGATATCCGTG
CACCACGCATTATCATCGCAGCATTGGTGGGTGCGGCGCTGGCTGTCTCCGGTGCGATCATGCAGACGGTGTTCACAACCCG
TTGGCGGATCCCGGCATTGTGGGTGTGTCTCCGGTGCAGCTGTTGCAGCTGTCTTGGCGATTGTCACCGGTGCGAGTTTCTT
TGGCCAATGGACCGTTCCTTTTGCGGCCTTCGTGGGCGCATTGGTCACGGTGGCTGTGGTATATTTGATCGCTAGTTCCCGCG
CGATGGATGGCCGTGGCGCAGATCCGGCCACGTGGTACTGGTCGGCATGGCTATCACTGCCTTTTGGGTGCTGTTATTTCC
AGCGCCACTGCGAACGCACCACAAGATTCTGAGCTTCGATCCGTGACGTTTTGGCTCAACGGCGATCTGGTATCTCGGACGTG
GGAACATGTGGGCGTTGCAATAATCCCCATTATCGTTGGGTGATTCTAGCTATCGGCGGTTCCCGCGATCTGAACCTGTTGC
TGGCTGGGTGATTCCACAGCGCAAACATCTGGACTCAACGTCAACCGCGCACGCATCATTTTGCTAGCACTTGCGGCACTGCTC
CGCCACAGCTGTTGCGGTCTCCGGCACCATTACGTTTGTGGATTGGTAGTACCCACCTGGTGCGCATTGTTTTAGGTGC
CGATCACCGAGCGTTACTCCCGGCCCGCGGATTTGGGCGCCACGTTTGTATCGTTTCCGACACTGTTGCCCGCATGATCT
TCTCCCCCATCGTCTTGCAAACAGGCGTGGTGGTGGCGTTCATTGGCTCACCAATTTTCCTTTATTTACTGCTCAGCATGCGC
AAGCGACGCGGATTGGGGCTG

RXN03079 - 3'-Region

TAAAAACTCATGCCTCAATTAGT

RXN02929 translatiert von RXN02929 (8015) von 1 bis 1038

VLKRIFLNPWVATALSVVILGFVVLFSGFSGVIDLSPTAVIRHLSGQDTLTPRDQAIFDIRLPRIAGVIVGATLAISGASY
QAVFRNPLADPYLLGVSAAGSLGVTAVIVGGTVLGFSAFVIGVIGAAVGGVAAVLATLMVSRGVGQGSSTTVVILAGVAVAA
FASSIQTYIQQRHIDTVARVYVWMLGNLNVNWNWSIFIVAVVAGLCAAVIMSCARLLDVMVAVGDVEARTLGVDPLVRIGIVI
VATLGTAAVVSISGLIGFVGIIVPHALRLIVGPGHRILLPLSFVWGAIFLVLADTAGRTLMAPELPGVVVTAALGAPFFLFI
LRRTSRQRPVKRSA

RXN02929 - 5'-Region

CAGGTGGGGACCTCGCGTATCCCAGCTGGTGGAAGAAATCGCAGCGCAGTTGAATCAGCTTGCTTCTTCTGAAGCTGTGCCGG
CCGCTGCTTAAGTTTTTC

RXN02929 - kodierende Region

GTGCTGAAGAGAATTTTCTCAACCCCTGGGTGGCTACCGCGTTGTCCGGTAGTCATTTTGGGGTTTGTGGTGCTGTTTTTCAGG
TTTGTAGCGGTGTTATTGATTTAAGCCCCACAGCAGTGATTAGACATTTGAGTGGGCAGGACACGCTCACCCCTCGAGATCAGG
CCATCTTCTTTGATATCCGGCTGCCTCGAATTATCGCTGGTGTCATTGTCCGGAGCAACGCTGGCTATTTCTGGTGCTTCTTAC
CAAGCGGTATTTAGAAACCCGCTGGCTGATCCTTATTTGTTGGGTGTGTCCGCAGGTTCTGGCCTTGGTGTCACGGCAGTGAT
TGTTGGCGGTACCGTGCTGGGATTTTCTGCACCGAGCATCGGCGTGATTGGTGACGATTTGTAGGTGGTGTTGCCGCAGTAC
TTGCCACGCTGATGGTGAGTCGGGGAGTAGGACAGGGATCATCAACCACCGTGTTATTTTGGCGGGCGTGCCGCTTGTCTGCT
TTTGCCAGTTCCATCCAGACCTATATTCAGCAACGACACATCGATACGGTGGCGCGCGTATATGTGTGGATGTTGGGCAACCT
CAATGTCACCAACTGGATGTGATCTTCATCGTGGCTGTGGTGGCGGGACTATGCGCGGCCGTGATCATGTCTGCGCCAGGT
TGTTAGACGTGATGGCTGTTGGTGATGTGGAAGCCCGCACATTGGGCGTCCAGGCCCTCGTACGCATTGGCATTGTCATC
GGCAACCCTTGGTACAGCTGCAGTGGTATCCATTTCCGGTCTCATCGGGTTTGTGGGCATCATTTGTTCCGCACGCCCTGCG
CCTAATTGTTGGCCCCGGGCATCGGATTTTACTGCCACTGTCTTTCGTATGGGGTGCCATTTTCTCTCGTGTGGCAGATACCG
CAGGGCGAACATTGATGGCTCCTCAGGAACCTTCCCGTGGGTGTGGTGACAGCTGCACTCGGCGCACCGTTCTTCTTATTTATT
TTGCGCAGAACCAGCAGACAACGAGTTCCAAAAAGGAGTGCT

RXN02929 - 3'-Region

TAAAGTGGCGATCATTGAATGCGA

RXN02987 translatiert von RXN02987 (9782) von 1 bis 234

MTAPATLKNTTLRSDEFTCPSCVAKIENKLNGLDGVENAEVKFSSGRILITHDPQKVSVRDLVTAVAIEVGYTAKPSAI

RXN02987 - 5'-Region

GTTGTTTGATCCAGGTCAAGGAATTAACCCGGAAAGGACCGTATCTTTAAAGGTGCAAGCACAGGAACATGACGATAAAAGAT
GAAAGGACCTGGTTACG

RXN02987 - kodierende Region

ATGACCGCCCCCGCCACGCTGAAGAACACCACCTTGCGCTCTGATGAGTTCACCTGTCCGAGCTGTGTCGCCAAGATCGAAAA
CAAGCTGAATGGTTTGGACGGCGTGGAGAATGCGGAGGTGAAGTTCTCCTCCGGACGCATCCTGATCACCCACGACCCACAGA
AGGTCTCCGTACGTGACCTGGTCACCGCGGTAGCCGAGGTGCGTTACACCGCCAAGCCGTCGGCGATC

RXN02987 - 3'-Region

TGACGCACTCCCGACCCACAAG

RXN02979 translatiert von RXN02979 (3131) von 1 bis 234

MTAPNTLKQTTLRSDEFSCPSCVSKIENKLNGLDGVDAEVKFSSGRILVDHDPKVS IKDLVA AVAEVGYTAKPSAI

RXN02979 - 5'-Region

CTAGGTCAAGGAACTTCACTCGGCTAGTCCTTAGACTCAAATGTGTTTCAGACAAACACTGGCACCGTAAGGCACGAAAGTTAC
CGAAAGGACTGGTTCCC

RXN02979 - kodierende Region

ATGACCGCCCCAAACACTCTCAAGCAAACAACACTCTTCGCTCTGATGAGTTCTCTTGCCCATCCTGTGTCTCCAAGATTGAAAA
CAAATTGAATGGATTGGATGGCGTCGACAATGCAGAGGTGAAGTTCTCCTCCGGAAGAATCCTTGTTGATCACGACCCCAGCA
AGGTCTCTATCAAGGATCTAGTCGCTGCAGTCGCAGAGGTTGGCTACACCGCAAAGCCATCAGCAATC

RXN02979 - 3'-Region

TAAAACTCTCAGTTAGACCATTA

RXN03109 translatiert von RXN03109 (7721) von 1 bis 654

MVVKEVDVEKQKAGRVPGAIKRRTVRIVLFVALGAIVIAASLWSILVGQYTIPIRDLPAILASGPTGAQTMAEQVWQIRMP
RIVLGLLVGAALGVAGALLQAVFSNPLAEPSSIIGVTSAGVGAACVIVFNLTFLLGTSTVAVGAFITAVITTILVYQLARSRGR
VQVINLILTGIAINAVSGALTSVLDLHRADELPRRNIFCRWVPHGSHGARQR

RXN03109 - 5'-Region

ACTGGCGCTTCCCGATGGTCAATCATTGGCCTTTGGTGCCCAAACCTGGCGAGTTGTTGCTCCGCGCATCCCGCGAACTGTATG
TGCAGGGCGGCGAGTAG

RXN03109 - kodierende Region

ATGGTTGTGAAGGAGGTTGACGTCGAAAAGCAAAAAGCTGGCCGGGTGCCTGGTGCTATAGCTAAGCGTCGGACCGTGCGGAT
TGTGCTGTTTGTGCGCGCTGGGCGCGATCGTGATTGCGGCGTCGCTGTGGTCGATTCTGGTCGGCCAATACACCATCCCGATTC
GCGATCTACCTGCGATTTTAGCCTCCGGTCCGACCGGTGCGCAGACGATGGCGGAACAAGTCGTGTGGCAAATCCGCATGCCG
CGCATCGTGCTGGGACTGCTCGTGGGTGCCGCTTTGGGCGTGGCCGGCGCGCTGTTGCAGGCGGTGTTTTCCAACCCGCTGGC
GGAACCGTCGATCATCGGCGTGACCTCCGGCGCGGGCGTGGGTGCTGCTGCGGTGATCGTGTTTAACCTGACATTTTTGGGCA
CATCCACCGTCGCAGTCGGCGCGTTTATTACCGCGGTGATCACCACGATTTTGGTATATCAGCTGGCCAGAAGCCGTGGACGT
GTGCAAGTGATCAACCTGATCCTGACAGGCATAGCCATTAATGCAGTATCCGGCGCGCTGACCTCAGTTCTTGATCTACATCG
CGCCGACGAGCTCCCGCGAAGAAATATTTCTGCAGATGGGTTCTTCACGGCTCGCATGGCGCACGTCAACGT

RXN02955 translatiert von RXN02955 (3206) von 1 bis 522

MMNFKSIVCVTAWQVFSRQVLHSPSTWSEELSKLLFVWLSFAGSAFLFGERGHIADVDFIARKLPVSAQRVLQVIVQLLIVVFA
ILGMIWGGYLAASIAWNQQLTALPLTLGWVYVVIPIAGVFIALFAIIDLIEVATGKEEPYPLVDESEPRDLDELEAQSAIDS
ASSAEGRN

RXN02955 - 5'-Region



ATGCACTGGCTCCCATCAAAGACGAATTCTTGACCTCAGAATTCAGCGTGAACTCTACGAAGCAGTGCGCGCCGCTGATACT
TCAGGAGGTGCGGCATC

RXN02955 - kodierende Region

ATGATGAATTTTAAGTCCATCGTGTGCGTCACTGCCTGGCAGGTGTTTAGCCGCCAGGTGCTGCACAGCCCATCAACGTGGTC
TGAAGAACTATCCAAGCTGTTGTTTCGTGTGGCTATCTTTCGCAGGTAGTGCGTTCCTCTTTGGAGAGCGTGGACATATTGCGG
TTGATTTTCATCGCGCGCAAACCTGCCTGTTTCTGCGCAGCGGGTCCTGCAGGTCATTGTTTCAGTTGTTGATTGTTGTTTTGCG
ATCCTCGGCATGATCTGGGGTGGCTACTTGGCTGCATCAATCGCGTGGAATCAGCAGCTCACTGCGCTGCCACTTACCTTGGG
ATGGGTGTATGTTGTCATCCCGATCGCGGGTGTGTTTCATCGCGTTGTTTCGCGATCATCGATCTCATCGAAGTGGCCACAGGCA
AGGAAGAGCCTTACCCCTTGTGTGATGAATCAGAAGAACCTCGAGATTTGGACGAGCTAGAGGCCCAAAGCGCTATAGATTCT
GCAAGTTCAGCGGAAGGTAGGAAC

RXN02955 - 3'-Region

TAATATGTTGTGCGCCAGCAGCTG



RXN03160 translatiert von RXN03160 (3585) von 1 bis 468

VNRIAEIARSFGVLGFSAFGGPTAHLGYFRTEFVERRRWLDDRQYSEIVALSQLLPGPSSQVGMMLGYHRAGFSGMAIAWLM
FTWPSLALMAAFALLFDATSASWTLGLLAAAVAVVFKRSHRAWRGSMASSTPGRRPSPGVGLGASRVLGPPQRG

RXN03160 - 5'-Region

GAGCATATGGTGCGCGCGGCCGATATGCTGATCAATTCCAACCCCGATCCGCACGCTTAACTTCTGCCAAAAGTCGTTTTGA
CCATAAGCTAAGCGATT

RXN03160 - kodierende Region

GTGAATCGAATTGCAGAAATCGCACGCAGTTTCGGCGTGCTGGGCTTCAGCGCTTTCGGCGGCCCCACCGCGCACCTCGGATA
TTTCCGCACGGAATTCGTGGAGCGGCGGCGCTGGCTGGATGATCGCCAATATTCCGAGATCGTAGCGCTCAGCCAACTACTTC
CCGGACCTGGATCGTCGCAGGTCGGTATGATGCTGGGCTACCACCGCGCCGGTTTTTCCGGCATGGCGATCGCCTGGCTCATG
TTTACCTGGCCCTCATTGGCGCTCATGGCGGCGTTCGCCCTGCTTTTTGATGCGACCTCCGCCAGCTGGACGCTCGGCCTGCT
CGCCGCAGCGGTGCGCCGTCGTTTTCAAACGCAGTCACCGGGCATGGCGCGGTTCAATGGCTTCCACGCCGGGGCGCCGGCCAC
CATCGGGGGTTCGGCCTCGGGGCATCGCGGGTGCTCGGCCCTCCCCAACGGGGT

RXN03160 - 3'-Region

TAACACACCTTGGGGTTCAATCA

RXN03095 translatiert von RXN03095 (5530) von 1 bis 369

MNADKKMCGMNPDSQYVELAVEVFGLLADATRVRIILALRNSGELSVNHLADIVDKSPAAVSQHLARLRMARIVSTRQEGQRV
FYKLTNEHASQLVSDAIFQAEHTIADGQTPPHHHREREQS

RXN03095 - 5'-Region

AACGCCTCAATTAGTGCCAGACCTTGCCGACCGCAGACCAAACCTTCACCATTTCAAACCATCCCTAGCCACAACAACGGCAGT
TGTGCAATGATCTGCGT

RXN03095 - kodierende Region

ATGAATGCAGATAAGAAAATGTGCGGAATGAACCCGGATAGCCAATACGTCGAACTTGCCGTCGAAGTTTTTCGGACTCCTCGC
GGACGCCACTCGAGTTCGCATCATCTTGCGCACTTCGAAACAGTGGTGAACTTTCCGTAAACCACCTCGCGGACATCGTCGATA
AATCCCCCGCAGCAGTTTCCCAACACCTCGCCCGGCTGCGCATGGCCCGAATCGTGTCCACCCGTCAAGAAGGTCAACGAGTT
TTCTACAAACTCACCAATGAACACGCATCACAGCTAGTCTCCGACGCTATTTTTCAGGCGGAACACACCATTGCGGACGGCCA
GACTCCCCCACACCACCACCGAGAACGAGAACAATCA

RXN03095 - 3'-Region

TGACCACCCACAGTCACCAAGAA

RXN03097 translatiert von RXN03097 (8524) von 1 bis 555



ISASAGAIGWLILEYIFKKTTSSLGLLL GALAGLVVITPAAGYVTYLSATIMALIGGICCYIVINYIKVKLKYHDALDAF
GIHGVGGIIGAVLTAVFQSKKANPDIENGFIYTGDIHIILVQILCVTAVVIFSIVMTFIIAKVIKLITPLSVTEQETNIG
LDKIVHGEHAYFEGELNRFNKHIRY

RXN03097 - kodierende Region

ATTTTCAGCCAGTGCAGGTGCTATAGGTTGGTTAATTTTAGAATATATTTTTTAAAAAGACGACAAGTTTACTTGGACTTTT
ACTCGGTGCATTAGCAGGATTAGTTGTTATTACTCCTGCAGCAGGATATGTAACATATCTTAGTGCAACAATAATGGCTT
TAATAGGAGGTATCTGTTGTTATATTGTCATTAATTACATCAAGGTAAACTAAAAATATCATGATGCATTAGATGCATTT
GGTATTCATGGTGTGGTGGTATTATTGGTGCCTGTTTTAACAGCAGTTTTTCCAAAGTAAAAAGCCAATCCTGACATTGA
GAATGGCTTTATTTATACTGGTGACATACATATTATACTTGTACAAATATTATGTGTAACAGCAGTTGTAATTTTTAGTA
TCGTCATGACGTTTATTATTGCGAAAAGTAATTAAATTAATTACACCATTATCTGTTACGGAACAAGAAACGAATATAGGA
TTAGACAAGATTGTTTCACGGTGAACATGCTTACTTTGAAGGTGAGCTAAATAGATTCAATAAACATATTTCGATAT

RXN03097 - 3'-Region

TAGAATATATTTACATAGAATAT



RXN00349 translatiert von RXN00349 (102) von 1 bis 1467

MLSFATLRGRISTVDAAKAAPPSPLAPIDLTDHSQVAGVMNLAARIGDILLSSGTSNSDTKVQVRVAVTSAYGLYYTHVDITL
NTITIFTNIGVERKMPVNVFHVVGKLDTNFSKLSEVDRLIRSIQAGATPPEVAEKILDELEQSPASYGFPVALLGWAMMGAV
AVLLGGGWQVSLIAFITAFITIIATTSFLGKKGLPTFFQNVVGGFIATLPASIAYSALQFGLAIKPSQIIASGIVVLLAGLTL
VQSLQDGITGAPVTASARFFETLLFTGGIVAGVGLGIQLSEILHVMLPAMESAAAPNYSSTFARI IAGGVTA AAFVGCYAEW
SSVIIAGLTALMGSAFYLLFVVYLGPVSA AAIATAVGFTGGLLARRFLIPPLIVAIAGITPMLPGLAIYRGMATLNDQTLN
GFTNIAVALATASSLAAGVVLGEWIARRLRPRFPNYPYRAFTKANEF SFQEEAEQNQRQRKRPKTNQRFNGKR

RXN00349 - 5'-Region

TGTGTACATCACAATGGAATTCGGGGCTAGAGTATCTGGTGAACCGTGCATAAACGACCTGTGATTGGACTCTTTTTCCTTGC
AAAATGTTTTCCAGCGG

RXN00349 - kodierende Region

ATGTTGAGTTTTGCGACCCTTCGTGGCCGCATTTCAACAGTTGACGCTGCAAAAGCCGCACCTCCGCCATCGCCACTAGCCCC
GATTGATCTCACTGACCATAGTCAAGTGGCCGGTGTGATGAATTTGGCTGCGAGAATTGGCGATATTTTGCTTTCTTCAGGTA
CGTCAAATAGTGACACCAAGGTACAAGTTCGAGCAGTGACCTCTGCGTACGGTTTGTACTACACGCACGTGGATATCACGTTG
AATACGATCACCATCTTCACCAACATCGGTGTGGAGAGGAAGATGCCGGTCAACGTGTTTCATGTTGTAGGCAAGTTGGACAC
CAACTTCTCCAAACTGTCTGAGGTTGACCGTTTGATCCGTTCCATTGAGGCTGGTGCGACCCCGCTGAGGTTGCCGAGAAAA
TCCTGGACGAGTTGGAGCAATCCCTGCGTCTTATGGTTTCCCTGTTGCGTTGCTTGGCTGGGCAATGATGGGTGGTGGTGGT
GCTGTGCTGTTGGGTGGTGGATGGCAGGTTTCCCTAATTGCTTTTATTACCGGCTTCACGATCATTGCCACGACGTCATTTTT
GGGAAAGAAGGGTTTGCCTACTTTCTTCCAAATGTTGTTGGTGGTTTTATTGCCACGCTGCCTGCATCGATTGCTTATTCTT
GCGTTGCAATTTGGTCTTGAGATCAAACCGAGCCAGATCATCGCATCTGGAATTGTTGTGCTGTTGGCAGGTTTGACACTC
GTGCAATCTCTGCAGGACGGCATCACGGGCGCTCCGGTGACAGCAAGTGCACGATTTTTCGAAACACTCCTGTTTACCGGCGG
CATTGTTGCTGGCGTGGGTTTGGGCATTGAGCTTTCTGAAATCTTGATGTCATGTTGCCTGCCATGGAGTCCGCTGCAGCAC
CTAATTATTCGTCTACATTCGCCCCGATTATCGCTGGTGGCGTCACCGCAGCGGCCCTTCGCGAGTGGGTTGTTACGCGGAGTGG
TCCTCGGTGATTATTGCGGGGCTTACTGCGCTGATGGGTTCTGCGTTTTATTACCTCTTCGTTGTTTATTAGGCCCCGTCTC
TGCCGCTGCGATTGCTGCAACAGCAGTTGGTTTCACTGGTGGTTTGCTTGCCGTCGATTCTTGATTCCACCGTTGATTGTGG
CGATTGCCGGCATCACACCAATGCTTCCAGGTCTAGCAATTTACCGCGGAATGTACGCCACCCCTGAATGATCAAACACTCATG
GGTTTCACCAACATTGCGGTTGCTTTAGCCACTGCTTCATCACTTGCCGCTGGCGTGGTTTTGGGTGAGTGGATTGCCCGCAG
GCTACGTCGTCCACCACGCTTCAACCCATACCGTGCATTTACCAAGGCGAATGAGTTCTCCTTCCAGGAGGAAGCTGAGCAGA
ATCAGCGCCGGCAGAGAAAACGTCCAAAGACTAATCAGAGATTCCGTAATAAAAGG

RXN00349 - 3'-Region

TAAAAATCAACCTGCTTAGGCGT

RXN00298 translatiert von RXN00298 (2826) von 1 bis 1845

MSSNIAITTEPEGKNNKGLKSDPFIFSISVGFIVVFVIATIALGEKARTTFSAIAGWLLNLGWMYIGGVSLVFIFLMGIFAS
RYGRVKLGDDDDDDPEHTLIVWFCMLFAGGVGAVLMFWGVAEPINHA FNVP MANEESMSEAAIVQAFAYTFYHFGIHMVIMAL
PGLSLGYFIYKRKLPPRLSSVFSPI LGKHIYSTPGKLIDVLAIVGTTFGIAVSVGLGVLQINAGMNKLWSTPQVSWVQLLIIL
IITAVACISVASGLDKGIKLLSNINIAMAVALMFFILFTGPTLTLLRFLVESFGIYASWMPNLMFWTDSFQDNPGWQKGWTVF
YWAWTICWSPYVGMFVARISRGRTVREFIGGV LALPAIFGVVWFSIFGRAGIEVELSNPGFLTQPTVVEGDVPAALFNVLOEY
PLTGIVSAFALVIIIVIFFITSIDSAALVNDMFATGAENQTPTSYRVMWACTIGAVAGSLLIISPSSGIATLQEVV IIVAFPPF
LVQFVMMFSLKGMSEDA AAVRRVQTRQWEKTDTP E KLEEHSSQ PAPGYDDEGNPLPMPALEHDEDGNIVIPGNV VIEGDLGV
VG DVVDDPEEAQEMGSRFKIVEQTRPQSRDEYDI

RXN00298 - 5'-Region

TTTAGACAAGTTCTGGTTAAAATTCTTCATGAAGGTGAGAATCTGGGAATTTCTCGGTACTCTTTCAGATTCGTAGTTATCCA
CTGATTGGAAGAATGAG

RXN00298 - kodierende Region

ATGAGCTCAAATATAGCTATCACGACCGAGCCTGAAGGGAAAAATAAAAAGGGTCTCAAATCAGACCCGTTCA TTTTTTCCAT
TTCTGTGCGTTTTATCGTGGTGTTTGT CATCGCCACAATTGCGCTAGGCGAGAAAGCTCGAACAACTTTTCCGCGATTGCCG
GCTGGCTCTTAGAAAATTTAGGGTGGATGTATATCGGGGGTGCTCCTTGTTTTTCATTTTCTCATGGGTATCTTTGCGTCC
CGGTATGGCCGGGTAAAAC TTGGTGATGACGATGATGACCCCGAGCACACCCTAATCGTGTGGTTCTGTATGCTTTTTTGCTGG
CGGTGTGCGGTGCAGTCTTAATGTTTTGGGGTGTTGCCGAACCGATTAACCACGCGTTCAACGTGCCAATGGCTAATGAAGAAT
CCATGAGTGAAGCCGCAATTGTGCAGGCTTTTGCTTATACTTTCTATCACTTCGGTATTCACATGTGGGTAATCATGGCACTC
AGGATTATCATTGGGATACTTTATTTACAAACGTAAGCTACCTCCCCGTCTATCCTCTGTGTTTTCTCCGATCTTGGGTAA
GCACATTTATTCACACCCGGCAAGCTCATCGATGTA CTGGCCATCGTAGGCACCACGTTTGGTATTGCTGTGT CAGTAGGTC
TTGGTGCTGCAAATCAATGCAGGTATGAACAAACTATGGAGCACCCCGCAAGTATCGTGGGTT CAGCTTTTGATCATCTTG
ATCATCACCGCGGTTCATGTATTTCCGTTGCTTCCGGTTTGGATAAGGGCATTAAGTTACTGTCCAACATTAATATTGCAAT
GGCCGTTGCGTTGATGTTCTTCATCTTGTTCACTGGTCCAACCCTCACATTGCTGCGCTTTCTCGTAGAATCCTTCGGAATCT
ATGCATCCTGGATGCCTAATCTGATGTTTTGGACTGACTCTTTCCAAGATAACCCAGGCTGGCAGGGCAAATGGACGGTGTTT
TATTGGGCATGGACTATTTGTTGGTCGCCATATGTCCGCATGTTCTGTTGGCGCGTATTTTCGCGTGGACGTACCGTCCGTGAATT
TATCGGTGGGGTTCTAGCTCTGCCAGCGATCTTTGGCGTAGTTTGGTTCTCTATCTTTGGTTCGTGCAGGCATCGAAGTGGAAC
TGAGTAACCCAGGTTTCTTGACCCAGCCAAC TGTGTTGAAGGTGACGTGCCAGCAGCGCTTTTTAATGTGCTGCAAGAGTAT
CCGCTGACTGGAATTGCTCTCCGCGTTTGCACTTGTAATTATGTGATTTTCTTTATCACCTCCATCGATTCCGCAGCGCTAGT
TAACGATATGTTTCGCTACCGGTGCAGAAAATCAAACACCGACTAGTTACCGCGTGATGTGGGCCTGCACCATTTGGGGCGGTCTG
CAGGTTCTTGCTGATCATTTCCCCATCCTCTGGTATTGCCACGCTGCAAGAAGTGTTATCATCGTGGCTTTCCCATTTCTTC
CTCGTGCAATTTGT CATGATGTTTTCTTTGCTTAAAGGCATGAGTGAAGATGCTGCTGCGGTTTCGTGCTGTGCAGACTCGTCA
GTGGGAAAAGACTGATACACCAGAAAAACTTGAAGAGCATTCGTCCCAACCAGCCCCGGGCTATGATGACGAGGGCAACCCCT
TGCCAATGCCTGCCCTCGAACATGATGAGGACGGTAACATTGTTATCCCAGGCAACGTAGTCATTGAAGGTGATCTTGGGGTA
GTTGGTGATGTGGTCGACGATCCTGAGGAAGCCCAAGAGATGGGGTCTCGTTTTAAGATCGTCGAGCAAAC TCGGCCCCAGTC
CAGGGACGAATACGATATT

RXN00298 - 3'-Region

TAAACGATTGCTTTTCGACGCAC

RXN00201 translatiert von RXN00201 (716) von 1 bis 192
VADCGLPIPEHVEIIDLALVFGIPTFEQVLNALKPEVVVEGAVIAEGAPQRIREMVDTDVEVCA

RXN00201 - 5'-Region

ACGTCGCGGACTTCAAGTAGTCGGCGATGAAAAAGTCCGTTTACTAAACCCCGATCTGTGTTACGCCATCGCGCGGCTCGGGC
ACACCGATACCTGGGCA

RXN00201 - kodierende Region

GTGGCAGATTGCGGATTACCCATCCCAGAACACGTAGAGATCATCGATTTGGCACTCGTGTTTGGGATCCCCACCTTTGAACA
AGTACTGAATGCTCTCAAGCCGGAAGTAGTTGTGGAAGGCGCGGTGATTGCCGAAGGGGCACCCCAACGTATCCGCGAAATGG
TGGATACGGATGTGGAAGTATGTGCG

RXN02993 translatiert von RXN02993 (5702) von 1 bis 672

VAEYVVNSIADDKGWDHPTIEWRESPSAQRETLIQNGEVDMAATYSINAGRSESVNFGGPYLLTHQALLVRQDDDDRIET
LEDLDNGLILCSVSGSTPAQKVKDVLPGVQLQEYDTYSSCVEALSQGNVDALTDDATILFGYSQQYEGDFRVVEMEKDGE
PFTDEYYGIGLKKDDQEGTDAINAALERMYADGTFQRLLTENLGEDSVVVEEGTPGDLSFLDAS

RXN02993 - kodierende Region

GTTGCTGAATACGTAGTCAACTCCATCGCTGATGACAAGGGCTGGGATCACCCCACCATCGAATGGCGTGAAATCCCCTTC
TGCGCAGCGTGAAACCCCTCATTCAAAACGGTGAGGTAGACATGATCGCAGCAACCTACTCCATCAACGCTGGCCGTTTCAG
AGTCCGTCAACTTCGGTGGCCCATACCTGCTTACCCACCAGGCTCTGCTTGTTGCGCAAGATGACGATCGCATTGAAACC
CTCGAGGACTTGATAACGGTTTGATCCTGTGCTCCGTTTCCGGATCCACTCCAGCTCAGAAGGTCAAGGATGTCCTCCC
AGGCGTTTCAGCTCCAAGAATACGACACCTACTCTTCTGTGTTGAGGCACTGTCCCAGGGCAACGTTGACGCCCTGACCA
CTGACGCCACCATCCTCTTCGGCTACTCCCAGCAGTACGAAGGCGACTTCCGCGTTGTGGAAATGGAAAAGGACGGCGAG
CCATTACCGACGAGTACTACGGCATTGGCCTGAAGAAGGATGACCAGGAAGGCACCGACGCTATCAACGCCGCACTTGA
GCGCATGTACGCTGACGGCACCTTCCAGCGACTGCTCACCAGAGAACCTCGGTGAAGACTCCGTGGTTGTTGAAGAAGGCA
CCCCAGGTGACCTCTCCTTCCTCGACGCAAGC

RXN02993 - 3'-Region

TAGTGTGACGGCTTTTAAAAGCC

RXN03103 translatiert von RXN03103 (5397) von 1 bis 243

MSAKRTFTRIGAILGATALAGVTLTACGDSSGGDGLAAIENGSVNVGTKYDQPGLGLRNPDNSMSGLDVDVAEYVIQLHR

RXN03103 - 5'-Region

ATCTTCAGAGTCACTTCTTTTCAGTGTCATTTTTCTCGGCCCTAATCCCCCGCTGGAGTTCAATCAGCGATTGCAACCTTTTAG
ATATATAAGGAGACAAC

RXN03103 - kodierende Region

ATGTCTGCAAAGCGTACTTTTACCCGTATCGGTGCGATTCTTGAGCAACTGCACTTGCCGGAGTTACCCTCACCGCCTGTGG
TGATTCAAGCGGTGGCGACGGATTCCTCGCAGCCATTGAAAATGGTTCTGTCAATGTCGGCACCAAATACGATCAGCCTGGTC
TTGGCCTCCGCAACCCAGACAACCTCCATGAGCGGTCTCGACGTGGATGTTGCTGAATACGTAATTCAACTCCATCGC

RXN03103 - 3'-Region

TGATGACAAG

RXN00297 translatiert von RXN00297 (2827) von 1 bis 912

MGFTVVVFIVIGIGWILGRRDTLGTHAQKPLSLFVYYVATPALLFDRVTKSDTSTIFSLNFFVIALSALIVGFLFFLLMRFVIK
RTAAVSVIGMLAASYANAGNLGIPLAAYILDDFTVVIPVILFQVAFYAPITMTIMEMLTNKKSTNLVRNLLVTPLTNTMVLAA
IAGIAVSLTSMSPVIVIAQPVEMLANASVPLALVVFGLSLSKSKILEKGQVSRRDVFTAALFKNVLHPIVAGLLALAFGMEGT
ALLSAVILGALPTAQNVYTYALRFTAESMARDTGVVTTLISFPVLVAVSIIFGS

RXN00297 - 5'-Region

AACAAGGCACCGGAAAACAAGCAACGCACCTTGCAGAGGTGGTCTTAAGCATCTTGGAGCAAAACAACATGGCACAATAACGA
TCATGCAACAGGTGCTC

RXN00297 - kodierende Region

ATGGGTTTCACGGTGGTGTTCATCGTCATCGGAATAGGTTGGATTCTCGGTAGAAGAGACACCTTGGGCACACATGCCAGAA
ACCTTTGAGCCTGTTTGTCTATTACGTGGCCACCCAGCGTTGTTGTTTGATCGGGTCACCAAGTCAGATACCTCGACGATTT
TCTCTCTGAACTTCGTGGTCATTGCACTCTCTGCGTTGATCGTAGGTTTCCTGTTTTTCTACTCATGCGGTTTCGTGATCAA
AGAACTGCCGCAGTATCGGTGATCGGCATGCTAGCTGCGTCCTACGCCAACGCCGGTAACCTGGGTATCCCTTTGGCAGCCTA
TATTTTGGATGATTTACCGTGGTGATTCCCGTGATTTTGTTCAGGTGGCGTTCTACGCACCGATCACCATGACCATCATGG
AGATGCTGACCAACAAGAAATCCACCAACTTGGTGCGCAACCTCCTGGTCACGCCACTAACCAACACCATGGTGCTCGCAGCG
ATTGCCGGTATTGCTGTGCTTTGACTTCGATGAGCGTGCCCGTGGTGATTGCTCAGCCAGTGGAATGTTGGCGAATGCTTC
AGTGCCACTGGCTTTGGTGGTGTTTCGGACTGTCTTGTCCAAGAGCAAGATCCTGGAAAAGGGGCAGGTATCCAGGCGCGATG
TGTTTACGGCGGCCTGTTCAAGAATGTTCTGCACCCAATTGTTGCGGGACTTTTAGCCTTAGCCTTTGGTATGGAAGGTACT
GCCTTGTTGTCGGCGGTGATTCTCGGTGCACTGCCAACAGCGCAGAATGTCTACACCTACGCGTTGCGATTTAGAACAGCTGA
GATGGCGAGAGACACAGGGGTGGTCACCACACTCATTCCTTCCCCGTATTGGTGGCGGTCTCCATTATCTTTGGATCT

RXN00297 - 3'-Region

TAGGGTTAGCATTAGTGGTCATG

RXN02348 translatiert von RXN02348 (8038) von 1 bis 1884

MLNRMKSARPKSVAPKSGQALLTLGALGVVFGDIGTSPLYSLHTAFSMQHNKVEVTQENVYGIISMVLWTITLIVTVKYVMLV
TRADNQGGGILALVALLKNRGHWGKFVAVAGMLGAALFYGDVVITPAISVLSATEGLTVISPSFERFILPVSLAVLIAIFAI
QPLGTEKVGKAFGPIMLLWFVTLAGLGIPQIIIGHPEILQSLSPHWALRLIVAEPFQAFVLLGAVVLTVTGAEALYADMGHFGA
RPIRVAVFCVVMPALILTYLGQALVINQPEAVRNPMFYLAPEGLRIPLVILATIATVIASQAVISGAYSLTKQAVNLKLLPR
MVIRHTSRKEEGQIYMPVLVNGLLFVSVMVVVLVFRSSESLASAYGLAVTGTLLVLSVLYLIYVHTTWWKTALFIVLIGIPEVL
LFASNTTKIHDGGWLPLLIAAVLIVVMRTWEWGS DRVNQERAELELPMDFLEKLDQPHNIGLRKVAEVAVFPHGTSDTVPLS
LVRCVKDLKLLYREIVIVRIVQEHVPHVPPEERAEMEVLHHAPIRVVRVDLHLGYFDEQNLPEHLHAIDPTWDNATYFLSALT
LRSRLPGKIAGWRDRLYLSMERNQASRTESFKLQPSKITITVGTELHL

RXN02348 - 5'-Region

AAAGACCCGAGCCGAAGCCCTGGCCTGCGCATACTTCCTTGTCAACGCTCGCTGGGATTAGGTCTTTTCTGAGCGCTAGCATT
TCTCCACTCAAAGGAGC

RXN02348 - kodierende Region

ATGCTTAACCGCATGAAAAGTGCGCGGCCAAAATCAGTCGCTCCAAAATCCGGACAAGCTTTACTCACTCTCGGTGCCCTAGG
TGTGTGTTCGCGGACATCGGCACACAGCCCCCTGTACTCACTTCACACTGCATTCAGCATGCAGCACAAAGTCGAAGTCA
CTCAGGAAAATGTGTACGGCATCATCTCCATGGTGTGTGGACCATCACTTTGATCGTCACCGTCAAATACGTCATGCTGGTC
ACCCGAGCTGACAACCAAGGACAAGGTGGCATCCTGGCGCTCGTTGCTTTGCTGAAAAACCGTGGGCACCTGGGGAAAATTCGT
GGCAGTAGCCGGCATGTTGGGCGCCGCATTGTTTTATGGCGATGTGGTGATCACCCGGCGATCTCTGTTCTCAGCGCAACAG
AAGGCTTGACGGTTATCTCCCCAAGCTTTGAGCGCTTATTCTGCCCCGATCTCTCGCAGTTCTGATCGCTATTTTTGCAATC
ACCGCTCGGTACAGAAAAAGTCGGCAAAGCCTTCGGCCCCATCATGTTGCTGTGGTTTGTACCCTTGCAGGATTGGGAAT
TCCGCAAATCATCGGGCACCCAGAAATCTTGCAGAGCTTGTCTCCACATTGGGCCCTGCGCTTGATTGTGGCTGAGCCTTTCC
AAGCATTTGTGCTGCTTGGTGCCGTTGTCCTGACAGTAACGGGTGCGGAAGCGCTCTACGCTGATATGGGCCATTTTGGGGCG
AGGCCAATCAGAGTGGCGTGGTTTTGCGTCGTCATGCCTGCTTTAATCTTGACGTATTTGGGGCAGGGCGCCTTGGTGATCAA
CCAGCCTGAAGCGGTGCGCAACCCCATGTTTTATCTCGCGCCGGAAGGTCTGCGGATTCCGTTGGTTATTTTGCGGACCATCG
CTACGGTGATCGCATCGCAGGCCGTGATTTCTGGTGCGTATTCAATTGACCAAGCAGGCCGTGAATTTGAAACTGCTGCCACGC
ATGGTGATCCGGCATACCTCCCGCAAAGAGGAAGGCCAGATCTATATGCCACTGGTTAATGGATTGCTGTTTGTATCCGTGAT
GGTTGTGGTGCTGGTATTCCGATCCTCTGAAAGCCTCGCCAGCGGTACGGACTTGCACTGACCGGAACCTTGGTGCTGGTCA
GCGTCCGTGTATCTGATCTATGTTACACCACATGGTGGAAAACAGCGCTGTTCAATTGTGCTCATCGGTATTCCAGAAGTACTT
CTATTCGCCTCGAACACCACGAAAATTCACGACGGTGGCTGGCTTCCACTACTTATTGCGGCCGTGCTCATCGTGGTGATGCG
GACCTGGGAGTGGGGAAGTGACCGCGTCAATCAGGAACGCGCAGAGCTGGAACCTTCCCATGGATAAGTTCTTGGAGAAACTCG
ATCAGCCACACAATATTGGTCTGCGTAAAGTTGCCGAAGTGGCAGTATTTCCACATGGCACACGAGATACTGTCCCGTTGTCA
TTGGTTCGCTGCGTGAAAGACCTCAAGCTTTTATACCGAGAGATCGTGATCGTTTCAATCGTCCAAGAACACGTTCCGCACGT
GCCACCAGAGGAACGCGCGGAAATGGAAGTGCTCCATCACGCCCCGATCAGAGTCGTGCGAGTTGATCTGCACCTTGGTTATT
TTGATGAGCAGAACCCTGCCTGAGCATCTCCATGCCATTGACCCAACATGGGATAACGCCACCTACTTCCCTGTCTGCCCTGACT
CTTCGGAGCAGGTTGCCTGGAAAGATTGCTGGCTGGCGTGATCGTTTGTATCTTTTCGATGGAACGTAATCAGGCATCTCGAAC
TGAGTCTTTCAAATTGCAACCAAGCAAAACCATCACGGTTGGAACAGAGCTGCACCTT

RXN02348 - 3'-Region

TAATCAGGCAGTTGCTGGCCAAC

RXN02395 translatiert von RXN02395 (9305) von 1 bis 1890

MSTNSGNNLPESQESPEEPHYPHDTHPGLVPGISVDAQRNKFGLDKTVFGVTAALILAFIAWGISSPDSVSSVSSTMFWSWAMT
NTGWLLNFVMLIGITMLYIAFSRYGRIKLGTDEDEPEFSRFSWIAMMFAGIGVGIFFFGPSEPLWHYLSPPPHTEVEGSTPE
SLHQALAQSHFWGLSAWGLYALVGGALAYSSYRRGRVTLISSTFRSLFGEKTEGIAGRLIDMMAIATLFGTAATLGLSAIQ
VGQGVQIISGASEITNNILIAIIAILTIGFIISSVSGVSKGIRYLSNLNISLTLGLVLFVFITGPTLFLLNLIPSSVLEYGSE
FLSMAGKSLSWGEETIEFQAGWTAIFYWAWWIAWTPFVGMFIARISRGRTLREFALITMAIPSFILILAFITIFGGTAITMNREN
VDGFDGSSSKEQVLDFMFSNPLYSITPFILIFVLAVFFVTSADSASVVMGMTMSSQGNPAPNKLIVVFWGLCMMGIAVVMLLT
GGESALTGLQNLTLILIAIPFALVLIVMAIAFIKDLSTDPAAIRQRYAKAAISNAVVRGLEEHGDDFELSIEPAEEGRGAGATF
DSTADHITDWYQRTDEEGNDVDYDFTTGKWADGWTPESTEEGEVDAKKD

RXN02395 - 5'-Region

AAACAGGAATATTTAACTCGACTTCTTAAAAAGCTCTATACGTAAATATCTTGCCCATCCAGCACACCTCATTGTGGTGCA
CAATGGAGAGGACACAC

RXN02395 - kodierende Region

ATGTCCACCAACTCTGGCAATAACTTGCCCTGAATCCCAAGAGTCACCCGAGGAACCTCATTATCCTCACGACACCCACCCAGG
CCTAGTTCCTGGCATTTCGGTCGATGCTCAACGCAACAAGTTCGGACTCGACAAAACCGTTTTTCGGCGTCACCGCAGCATTAA
TTCTGGCGTTTCATCGCCTGGGGCATTTCAGCCCTGATTTCGGTTTCTTCAGTATCGTCCACGATGTTTCAGTTGGGCTATGACG
AATACTGGTTGGCTCCTCAACTTTGTCTGATCGGCATTGGCACCATGCTCTACATCGCTTTTTTCGCGCTACGGCCGCAT
CAAGCTGGGCACGGACGAAGACGAACCAGAATTCTCTCGCTTTTCTGGATTGCGATGATGTTTCGGCGCCCGCATCGGTGTCCG
GTATCTTCTTCTTCGGTCCTTCCGAACCGCTGTGGCATTATCTCAGTCCCCACCTCACACCGTGAAGGATCTACACCTGAG
CTTGACCAAGCACTTGCGCAGTCCCACTTCCACTGGGGCTTATCCGCCTGGGGGCTGTATGCCTTGGTCGGCGGCGCGTT
GGCGTACTCCAGTTACCGACGCGGCCCGCTAACCTTGATCAGCTCCACCTTCCGGTCACTTTTCGGTGAGAAAACCGAAGGTA
TCGCGGGTCGCTCATCGACATGATGGCGATCATCGCCACGCTGTTTGGAACGGCTGCAACCTTGGGCCTTTCAGCAATTCAG
GTTGGTCAGGGCGTGAGATTATTTCTGGCGCTTCGGAAATCACCAACAACATCTTGATCGCCATCATCGCGATCTTGACCAT
TGGCTTCATCATCTCCTCAGTATCTGGCGTGTTCAAGGGCATTCGTTATCTTTCCAACCTCAATATTTCTTGACGCTTGGAT
TGGTCTGTTTGTGTTTCATCACCGGCCCCACCTTGTTCTGCTCAACTTGATCCCATCGAGTGTTGGAATATGGCAGTGAG
TTCTTGTCATGGCTGGCAAGTCTTTGTCGTGGGGTGAGGAAACCATTGAATTCCAAGCTGGTTGGACGGCGTTCTACTGGGC
ATGGTGATCGCATGGACTCCATTTCGTGGGTATGTTTCATCGCGCGTATTTCTCGCGGCCGACCTTGCCTGAATTCGCGCTCA
TCACCATGGCTATCCCTCCTTCATTTTGATCCTGGCGTTCACCATTTTCGGTGGAAGTCCCATCACGATGAACCGCGAGAAC
GTAGATGGTTTTGACGGCAGTTTCATCCAAGGAACAGGTGCTGTTTGATATGTTTCAGCAACCTTCCGCTGTACTCGATCACACC
GTTTCATTTTGATCTTTGTGCTGGCAGTATTCTTTGTTACCTCTGCCGATTCCGCCTCCGTGGTGATGGGAACGATGAGCTCCC
AAGGTAACCTTGACCAACAAATTAATCGTGTTCTGTTGTTCTGGGGACTGTGCATGATGGGCATCGCGGTGGTCATGCTGCTTACT
GGTGGCGAATCCGCGCTGACTGGTCTGCAGAACCTCACCATTTTGATCGCCATTCCGTTTGGCGTGGTGTGATCGTGATGGC
TATTGCCTTTATTAAGGACTTATCCACAGACCCAGCCGCTATTCGACAACGCTATGCAAAGGCAGCCATCTCTAACGCGGTGG
TTCGTGGCTTGGAAGAACACGGCGACGACTTCGAGCTCTCCATCGAACCTGCAGAGGAAGGTCGTGGAGCGGGTGCTACCTTC
GATTCCACCGCTGATCACATCACCGACTGGTATCAGCGCACCGACGAAGAAGGCAATGATGTTGATTATGACTTCACCACCGG
CAAATGGGCCGATGGTTGGACACCGGAATCGACCGAAGAAGGCGAAGTGGACGCGAAAAAGGAT

RXN02395 - 3'-Region

TAAAAAATAACGACTGGCTGGGA

RXN02447 translatiert von RXN02447 (8454) von 1 bis 1095

TVVPVYLAELEAPLEIRGSLTGRNELAIVTGQLLAFVINALIAVTLHGVIDGIWRIMFAVCALPAVALFLGMLRMPESPRW
LVNQGRYDDARRVMETVRTPERAKAEMDEIIIAVHSENNAALPGVKQSSGQASGQVSSKHTHMSIGEVLSNKWLVRLLIAG
IGVAVAQQLTGINAIMYYGTRVLEESGMSAEMAVVANIAFGAVAVIGGLIALRNMDRLDRRTTFIIGLSLTTFHLLIAA
AGTLLPEGNSIRPFAIMILVVGFLVSMQTFNLNAVWVWLAEIFPVRMKGIGTGISVFCGWGINGVLALFFPALVSGVGIT
FSFLIFAVVGVIALLAFVTKFVPETRGRSLEELDHAFTGQIFKKA

RXN02447 - kodierende Region

ACAGTAGTTCCGGTGTACCTCGCTGAACTCGCACCAGTAGAAATCCGCGGCTCCCTGACCGGCCGAAACGAGCTTGCTAT
CGTCACCGGCCAGCTGCTTGCCCTTCGTGATCAACGCGCTTATCGCCGTCACCCACACGGAGTTATTGATGGAATCTGGC
GCATCATGTTCCGCGTCTGTGCCCTCCCTGCCGTCGCCCTCTTCTCGGCATGCTGCGGATGCCGGAATCACCACGCTGG
CTGGTCAACCAGGGGCGTTACGACGACGCCCGCGCGTCATGGAGACCGTCCGTACCCCTGAGCGTGCGAAAGCCGAAAT
GGATGAAATCATCGCGGTGCACTCTGAAAACAATGCGGCACTTCTGGTGTAAAGCAGTCTTCGGGCCAGGCTTCAGGCC
AGGTTTCTAGCAAGCACACCCACATGTCCATCGGCGAAGTCCTCAGCAACAAATGGCTGGTTCGTCTGCTCATCGCCGGC
ATCGGTGTTGCAGTTGCCCAGCAGCTCACCAGCATCAACGCCATCATGTACTACGGAACCCGCGTCCTCGAGGAATCCGG
CATGAGCGCAGAAATGGCTGTGGTTGCCAACATTGCTTTCGGTGCCGTTGCCGTCATCGGTGGACTGATCGCACTGCGCA
ACATGGACCGCTGGATCGCCGCACCACCTTCATCATCGGCCTGTCACTGACCACCACCTTCCACCTTTTGATCGCAGCT
GCCGGCACTCTCCTTCCAGAAGGTAACCTCCATTGACCATTCGCCATCATGATCCTTGTTGTTGGGTTCTGTGCTCTCCAT
GCAGACTTTCCTCAACGTTGCAGTGTGGGTGTGGCTGGCGGAAATCTTCCCAGTCCGAATGAAGGGTATCGGCACCGGTA
TTTCGGTATTCTGCGGTTGGGGCATCAATGGCGTCCTAGCGTTGTTCTTCCCAGCACTGGTCTCCGGCGTGGGTATCACC
TTCTCCTTCTTATCTTCGCAGTCGTCCGAGTCATTGCCCTGGCGTTCGTACCAAGTTTGTTCTGAAACCCGTGGCCG
CTCACTTGAAGAACTCGATCACGCAGCATTCACCGCCAGATCTTCAAGAAGGCT

RXN02447 - 3'-Region

TAAACCCCTCCGATCTCTTTGG

RXN00960 translatiert von RXN00960 (4118) von 1 bis 1035

MARHCCSNRYASTVFSGLIAYGASQALYPWLLKDHQSVTEIDL DAGALQPYFNIEMPPPFVMTALLLAFCIGLCMAVIK
SDTLFKVTRELERVVMKTITAFVIPLLPLFIFGIFLGMGMNGGLLEIMSAFGKVLILAVVGTLLFLAIQFIIAGAVSKKN
PWKLFKNMLPAYFTALGTSSSAATIPVTYQQTCLKNDVDVNVAGFVVPLCATIHLAGSMMKIGLFTFAVVFMVDMEVGVGL
SIGFLLMLGITMIAAPGVPGGAIMAATGMLASMLGFNTEQVALMIAAYIAIDSFGTAAANVTGDGAIAVIVNKFPAKGQLHT
TSPDEIEEDDRVAFDITPSDVEHHK

RXN00960 - kodierende Region

ATGGCTCGGCATTGTTGCAGCAATCGCTACGCGTCCACCGTCTTCTCCGGTCTGATCGCCTACGGAGCATCCCAAGCGCT
CTACCCATGGCTGCTGAAAGACCACCAAAGCGTCACCGAAATCGACCTTGATGCAGGTGCCCTCCAGCCCTACTTCAACA
TCGAGATGCCACCACCATTTGAAGTGATGACCGCACTGCTGCTGGCATTTCTGCCTCGGCCTGGGCATGGCTGTAATTAAA
TCAGACACCCTGTTCAAGGTAACCCGCGAAGTTCGAGCGCGTAGTCATGAAGACCATCACC GCCTTTGT CATCCCACTGCT
GCCACTCTTCATCTTCGGCATCTTCCTCGGCATGGGCATGAACGGTGGCCTCCTGGAGATCATGTCCGCCTTTGGCAAGG
TACTGATTCTCGCCGTCGTGGGAACCTGCTCTTCCTAGCCATCCAGTTCATTATCGCTGGTGCAGTATCCAAGAAGAAC
CCATGGAAACTGTTCAAAAACATGCTCCCTGCATACTTCACTGCACTGGGCACCTTCCTCTTCAGCGGCAACCATCCCAGT
GACCTACCAGCAGACCCTGAAAAACGATGTTGATGTCAACGTCGCAGGCTTTGTTGTCCCACTGTGCGCCACCATCCACC
TAGCTGGATCGATGATGAAGATCGGCCTCTTCACCTTCGCTGTTGTCTTCATGTACGACATGGAAGTAGGCGTCGGCCTC
TCCATCGGATTCTCTCATGCTGGGCATCACCATGATCGCCGCACCAGGCGTTCCCGGCGGAGCCATCATGGCAGCAAC
CGGCATGCTGGCCTCCATGCTCGGATTCAACACCGAACAAGTCGCCCTCATGATCGCCGCTTACATCGCGATTGACTCCT
TCGGCACCGCAGCAAACGTCACCGGCGACGGCGCAATCGCAGTCATCGTGAACAAATTCGCCAAGGGCCAGCTGCACACC
ACTTCCCCAGATGAAATCGAAGAAGACGACCGCGTTGCCTTCGACATCACTCCATCGGATGTGGAACATCACAAG

RXN00960 - 3'-Region

TAGAAACCCGCATTTTCTGTAGT

RXN00449 translatiert von RXN00449 (92) von 1 bis 1581

MSTPDIKEGSAESPGEVMVVGDRREWRQATGIIAGLVLAALVYLLFPSNSVETVMQSSGVDPETEYTNNAMRLTAAVTILMA
VWWMTEAIPLAATALIPLVAFPAFQVVDVFGKATAPYANPTSFLFLGGFLMALGLQKWNLHRRMALAVVLAVGTPKPKQLVLGFM
VATGFLSMWVSNTATAVVMLPIGMSVLALTAETVGGMKNQKKFATGLMLSIAYSASIGSLGTLIGTPPNALLAAYMSESHDIH
IGFGQWMILGVPIAVVFTIIAWLVLTTFVKPEMKEIPGGRELIKREIAEMGPWTAPQVTVGVIFAAAAALAWVFIPLTLDWTGS
QLSINDSLIGIAAGLLMFIVPANFKTGERILDWRTAGELPWDVLLLFGGGLSLSAMFTSTGLSLWIGELAKGLDALPIFILIF
AIAVLVLFLTEFTSNTATAATFLPIMGGVAVGIGLTAGGEQNVLLLTIPVALSATCAFMLPVATPPNIAIFGSGYIKIGEMVK
GGLWLNIIAVILITIFTYFVAIPLFGIML

RXN00449 - 5'-Region

TCGTTGGCTTACATGGTCATTGATGACCGGGCTGAATATGTGAGAAAATCCATCCCTTCTTTAAGCAAGGGAGTGAATTACAG
AAAAGGATTGTTACAGCA

RXN00449 - kodierende Region

ATGAGCACACCTGACATTAAAGAAGGCTCGGCAGAAATCACCGGGCGAAGTAATGGTCGTTGGAGACAGGCGAGAGTGGCGTTCG
ACAAGCAACCGGCATCATTTGCCGGCCTCGTCTTAGCCGCCCTGGTCTATCTTCTCTTCCCCCTCGAACTCCGTGGAAACCGTCA
TGCAATCCAGTGGCGTCGATCCAGAACTGAATACACCAACAACGCGATGCGTCTTACTGCTGCAGTCACAATCTTGATGGCA
GTGTGGTGGATGACAGAAGCAATCCCACTAGCAGCAACCGCACTTATCCCGTTGGTTGCATTCCCTGCTTTCCAGGTTGTGGA
CTTTGGGAAGGCAACAGCTCCGTATGCCAACCCCTACGAGCTTCCTCTTCTTGGGCGGCTTTCTTATGGCACTTGGCCTGCAGA
AATGGAACCTACACCGACGTATGGCTCTAGCGGTCTGTGCTAGCTGTTGGTACTAAGCCAAAGCAATTGGTCTTGGGTTTTATG
CTGGCAACTGGATTTTTGTCCATGTGGGTGTCTAACACTGCAACGGCCGTGGTTATGTTACCGATCGGTATGTCGGTACTGGC
GACCGCTGAGACTGTGGGCGGAATGAAAAACCAAAAGAAATTCGCCACTGGACTCATGCTGTCCATTGCTTATTCTGCTT
CCATCGGTTCACTCGGCACCTTAATTGGCAGCCACCCAATGCCTTGCTTGCTGCGTATATGTCTGAATCGCATGATATCCAC
ATCGGATTTGGTCAGTGGATGATTCTTGGTGTACCAATTGCTGTCTGCTTACCATCATCGCGTGGCTTGTGTTGACCACCGT
GTTCAAGCCAGAAATGAAAGAAATCCCTGGCGGACGTGAACTGATCAAACGTGAAATCGCTGAAATGGGGCCGTGGACTGCAC
CTCAGGTCACAGTGGGTGTTATTTTTGCGGCAGCTGCACTGGCTTGGGTCTTCATTCCATTAACTCTAGATTGGACCGGTTCC
CAGCTCTCTATCAATGACTCCCTCATTGGCATCGCTGCCGGCTGCTGATGTTTATCGTTCCCGCTAACTTTAAAACCGGCGA
ACGCATTCCTTGATTGGCGTACTGCAGGCGAACTTCCATGGGATGTTCTCTTGCTTTTTGGTGGCGGGCTTTCACCTTCTGCGA
TGTTTACCAGCACGGGACTTTCCCTATGGATCGGTGAACTAGCTAAGGGACTTGATGCCCTTCCAATCTTCATTCTCATCTTC
GCCATTGCTGTCTTGGTGTGTTCTTGACCGAGTTCACCTCCAACACCGCAACAGCGGCAACCTTCCGTGCCAATCATGGGTGG
CGTCGCCGTAGGTATCGGACTGACCGCAGGTGGCGAGCAGAATGTTCTGCTGCTGACCATCCAGTCGCACTGTCCGCAACCT
GTGCGTTCATGCTTCCAGTGGCAACGCCTCCAAACGCGATTGCATTCCGGCTCCGGCTACATTAAGATCGGCGAAATGGTCAAG
GGTGGTCTGTGGCTGAACATCATCGAGTCATCCTCATTACGATTTTACCTACTTCGTAGCGATCCCACTCTTTGGCATCAT
GCTT

RXN00449 - 3'-Region

TAAAAGTTAACAGGCCCGCAGTC

RXN01411 translatiert von RXN01411 (3735) von 1 bis 765

MLGVGWRIPLMAVPLGLIGWWIRTGAQENVRPASERPEAPIKQALRTEWKMLRVGGFISCTGLSFYIFTTYMTTFLRS
TVGLEGTLLVLAGNIIALSMAAIVAPFVGRAIDKFPRRNIMAFATLSTVIMAIIPAYIIAGQGTLTASLIAQVMLGIGAVTA
NCVTSVMMAEVFQEVTRGTSAGITYNVTYAIFGGSAPFISTALVSWTGSPLAPAVYMI IIALFAFTASRFIPETSPVFVT
ATPAIKAPKVLVNPG

RXN01411 - 5'-Region

CTTATCGACGTCCCCATCCCCCTCGCCAATGCTTCGGCGAGGGGTCTATTTATTGTGTGTGCTAGCCTTTTCGCAATCG
TTCAGCCCCGCCCCGACGTCA

RXN01411 - kodierende Region

ATGTTGGGAGTGGGCTGGCGCATTCCATTCCCTGATGGCCGTGCCACTAGGGCTTATCGGCTGGTGGATCCGCACCGGTGC
CCAGGAAAATGTACGCCCCGCATCCGAACGCCCCGAAGCTCCTATTAAGCAGGCATTGCGTACTGAGTGGAAGATGATGT
TGCGGGTAGGTGGCTTTATCTCTTGACCCGGTCTGAGCTTCTACATTTTCACCACGTACATGACCACTTTCTTGCGCAGC
ACCGTCGGACTGGAGGGCACGTTAGTGCTGGCTGGAACATCATCGCTCTCAGCATGGCAGCAATTGTGGCCCCATTTGT
TGGCCGCGCAATTGATAAATTCCCCCGCCGGAACATCATGGCTTTGCTACCTTAAGCACAGTAATTATGGCGATCCCGG
CCTACATCATTCAGGTCAAGGTACTTTGACTGCTTCTTTGATTGCGCAGGTAATGCTTGGAATCGGCGCGGTACCGCT
A~~CT~~ACTGCGTTACCTCAGTAATGATGGCCGAGGTCTTCCAAGAGGTCACCCGCGGTACTTCCGCCGGCATTACCTACAACGT
CACTTACGCAATCTTCGGCGGCTCGGCTCCATTTATCTCCACCGCATTGGTCTCCTGGACCGGCAGCCCGCTGGCCCCTG
CGGTATACATGATCATCATTCGCTCTTCGCCTTCACCGCGTCCCGCTTCATTCCTGAAACCTCCCCAGTTTTTGTACC
GCAACCCCGGCCATTAAGGCACCAAAGGTGCTGGTCAACCCGGGT

RXN01411 - 3'-Region

TAAACCACGCTTTTCGACGAAAA

CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM-GENE, DIE PROTEINE CODIEREN, DIE AN DER MEMBRANSYNTHESE UND AM MEMBRANTRANSPORT BETEILIGT SIND

5 Zusammenfassung der Offenbarung

Isolierte Nukleinsäuremoleküle, die als MCT-Nukleinsäuremoleküle bezeichnet werden und neue MCT-Proteine aus *Corynebacterium glutamicum* codieren, werden beschrieben. Die Erfindung stellt
10 zudem Antisense-Nukleinsäuremoleküle, rekombinante Expressionsvektoren, die MCT-Nukleinsäuremoleküle enthalten und Wirtszellen, in die die Expressionsvektoren eingebracht worden sind, bereit. Sie stellt weiterhin isolierte MCT-Proteine, mutierte MCT-Proteine, Fusionsproteine, antigene Peptide und Verfahren zur
15 Verbesserung der Produktion einer gewünschten Verbindung aus *C. glutamicum* bereit, die auf der genetischen Manipulation von MCT-Genen in diesem Organismus beruhen.

20

25

30

35

40

45

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.